

ARTÍCULO ORIGINAL

Estudio de reproducibilidad del examen de cuantificación de VIH-1 por la técnica Nuclisens HIV-1 QT® en muestras de plasma de pacientes infectados con VIH-1

GABRIELA MUÑOZ G. y BQ. MAURICIO VENEGAS S.¹

REPRODUCIBILITY OF A QUANTIFICATION ASSAY, NUCLISENS HIV - 1 QT, IN HIV POSITIVE PLASMA SAMPLES

The viral load quantification for Human Immunodeficiency Virus in infected patients has been proved to be a valuable test as a good predictor for infection progression and antiviral treatment response. The reproducibility of a new viral load assay, Nuclisens HIV-1 QT™, was assessed by comparing different volume plasma samples in 11 HIV positive patients. Each sample was tested at least twice, in the same or different runs. A total of 29 tests were done. The best reproducibility was obtained when using an initial input equal or greater than 500 µl of plasma, with a precision rate of 0.18 and a coefficient of variation of 20%. The intra and inter - assay variation was 0.19 and 0.07, respectively. The good reproducibility found in this study, the easy performance and the wide linear range of quantification makes this assay fully recommended as a routine test for HIV viral load in HIV-1 infected patients.

Key words: HIV-1, Viral load, Nuclisens, HIV-1 QT™.

INTRODUCCIÓN

Hasta hace unos pocos años, la evaluación de los pacientes con infección por VIH se basaba exclusivamente en el recuento de las subpoblaciones linfocitarias, especialmente de células T del tipo CD4+. Sin embargo, con el desarrollo creciente de métodos de biología molecular, hoy es posible cuantificar la cantidad de virus que circula en la sangre y en otros fluidos biológicos. Esta medición es lo que llamamos **carga viral**, la cual se expresa en número de copias del genoma viral por mililitro de muestra, que en el caso del VIH corresponde a copias de ARN /ml.

La determinación de la carga viral ha demostrado ser un valioso marcador para la predicción del progreso de la enfermedad y para el monitoreo de la eficacia de una terapia antiviral en los pacientes VIH/SIDA.¹

En 1997 nuestro laboratorio evaluó una nueva técnica comercial para la medición de la replicación viral en pacientes infectados por VIH-1 denominada NUCLISENS HIV-1 QT® (Organon Teknika). Esta corresponde a la nueva generación de la técnica de NASBA, donde se ha mantenido el principio del método (3SR, *Self Sustained Sequence Replication*) y se ha aumentado el límite inferior de sensibilidad de 400 copias a 40 copias de ARN /ml.

¹ Laboratorio de PCR - Gastroenterología, Centro de Gastroenterología. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Es nuestro interés dar a conocer los resultados obtenidos en la evaluación de esta metodología puesto que ésta se está utilizando de rutina desde 1997 para el control de los pacientes beneficiarios del Sistema Nacional de Servicios de Salud (SNSS), con un promedio de 4.000 exámenes anuales.

A la fecha, existen en el mercado nacional tres alternativas comerciales para la cuantificación de VIH-1: Amplicor-HIV Monitor® (Roche Molecular Systems), Quantiplex HIV-RNA Assay® (Chiron Corporation) y Nuclisens HIV-1 QT® (Organon -Tecnika). Cada una de ellas está basada en un método diferente: amplificación de ADN por RPC-TR cuantitativa, amplificación de señales (*branched DNA*) y amplificación de secuencias de ARN, respectivamente.

La técnica Nuclisens se basa en la co-amplificación del ARN del VIH-1 de una muestra junto con tres calibradores internos de alta, mediana y baja concentración, lo cual permite una correcta evaluación de la eficiencia de la amplificación individual de cada muestra. La amplificación se desarrolla mediante tres enzimas que no requieren cambios de temperatura (reacción isotérmica), obteniéndose una acumulación exponencial de ARN viral a través de transcripciones y retrotranscripciones utilizando ADN como intermediario. La cantidad de ARN que se obtiene es medida por electroquimioluminiscencia (ECL) a través de sondas marcadas con rutenio y perlas magnéticas que capturan el ARN. El rango de sensibilidad de este método se describe entre 80 y 10⁷ copias de ARN/ml para un volumen inicial (*input*) de 1 ml, y hasta 40 copias al utilizar 2 ml de muestra.

MATERIAL Y MÉTODO

Nuestro estudio consistió en evaluar la reproducibilidad de esta técnica con 11 muestras de plasma de 11 pacientes infectados con VIH, las cuales fueron procesadas en duplicado, la mayoría, y una hasta en 6 oportunidades. Se realizó un total de 29 determinaciones, evaluando la reproducibilidad intra ensayo (9 muestras en duplicado o triplicado) e inter ensayo (5

muestras) utilizando distintos volúmenes iniciales de plasma (*input* de 200 hasta 1.000 µl). Las muestras de plasma fueron conservadas a -70° C, sin descongelar, hasta su procesamiento. Todos los ensayos fueron realizados, en forma conjunta, por dos profesionales del Laboratorio de Gastroenterología - PCR del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, siguiendo estrictamente las recomendaciones del fabricante previa capacitación otorgada por los representantes. Para la extracción de ácidos nucleicos se utilizó el método manual. En todos los ensayos se utilizó un mismo lote de reactivos donados gentilmente por Organon-Tecnika. Las muestras de plasma fueron aportadas por el Laboratorio de Inmunología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y correspondieron a pacientes infectados con VIH confirmados, en control de pre o intratratamiento.

El método Nuclisens HIV-1 QT® presenta varias características que lo diferencian de los otros tests disponibles para la cuantificación viral que explicarían su alta sensibilidad y amplio rango de detección, en efecto:

- Incorpora en su método de extracción de ácidos nucleicos un sistema de "captura" por medio de partículas de sílica que se agregan a un *buffer* de lisis junto con la muestra del paciente. Este sistema aumentaría la sensibilidad y disminuiría los riesgos de contaminación cruzada en esta etapa del procedimiento.
- En la etapa de amplificación se realiza una co-amplificación del ARN de la muestra en estudio y 3 calibradores internos conocidos (Qa, Qb, Qc) que permiten evaluar y validar la eficiencia del proceso completo (desde la extracción hasta la detección) para cada muestra por separado. El resultado final se calcula en base a la interpolación lineal de los valores obtenidos en los calibradores en cada muestra individualmente, no requiriéndose realizar el procedimiento en duplicado. La validación de cada resultado es estricta por cuanto requiere que al menos dos de los calibradores estén dentro de los rangos estrictos esperados. Por tratarse la amplificación de una reacción isotérmica de transcripción de ARN, las moléculas de doble hebra (ADN) no se denaturan y por lo tanto no se

amplifican. Esto tiene dos ventajas importantes: se elimina el riesgo de contaminación y *carry-over* por ADN, y se obtiene una discriminación entre el ARN viral (que se amplifica) y el ADN pro viral (que no se amplifica) lo cual implica una medición cuantitativa más exacta, que refleja sólo el material genético circulante como partícula viral.

- Finalmente, la detección se realiza por otro sistema de "captura" por medio de sondas

específicas, unas marcadas con rutenio y otras adosadas a una perla magnética, que son capturadas por un lector de quimioluminiscencia al pasar por un electromagneto. Si bien en esta etapa se requiere hacer diluciones de los amplificados para la hibridación específica con cuatro sondas diferentes, por tratarse de ARN, esto no produciría mayores problemas de *carry-over* (falsos positivos) por la inestabilidad del ácido nucleico.

Tabla 1. Resultados de la cuantificación de VIH-1 por Nuclisens HIV-1QT® con diferentes volúmenes iniciales de plasma de pacientes infectados con VIH

Paciente	Volumen plasma (ml)	Copias ARN/ml	Log ₁₀ copias ARN/ml	Ensayo
1	1.000	370.000	5,57	CV - 2
	1.000	580.000	5,76	CV - 2
	500	440.000	5,64	CV - 2
	200	700.000	5,84 *	CV - 2
	500	440.000	5,64	CV - 3
	500	450.000	5,65	CV - 3
2	500	3.800	3,58	CV - 2
	1.000	2.800	3,44	CV - 6
3	1.000	590.000	5,77	CV - 2
	200	1.100.000	6,04 *	CV - 2
	500	300.000	5,47	CV - 2
4	1.000	< 80	< 1,90	CV - 3
	300	< 80	< 1,90	CV - 3
	1000	680	2,83 **	CV - 4
5	1.000	> 10.000.000	> 7,0	CV - 3
	1.000	6.400.000	6,80	CV - 3
6	300	140.000	5,15 *	CV - 3
	1.000	369.000	5,59	CV - 4
7	1.000	57.000	4,75	CV - 6
	1.000	39.000	4,59	CV - 6
8	1.000	810.000	5,91	CV - 6
	1.000	1.700.000	6,23	CV - 6
9	1.000	720.000	5,86	CV - 6
	1.000	830.000	5,92	CV - 6
10	900	36.000	4,56	CV - 6
	900	41.000	4,61	CV - 6
11	500	770.000	5,87	CV - 8
	500	400.000	5,60	CV - 8
	1.000	510.000	5,71	CV - 9

* Resultados con mayores diferencias, no significativas. ** Resultado con diferencia significativa.

Tabla 2. Resultados del análisis de reproducibilidad de la cuantificación de VIH-1 por Nuclisens HIV-1 QT® expresados en log₁₀

Paciente	Carga viral promedio Log ₁₀ copias de ARN/ml	Variación máxima	Rangos	Coefficiente variación copias de ARN (%)
1	5,68 ^a 5,65 ^b	0,27 0,19	5,84 - 5,57 5,76 - 5,57	25-41 19-27
2	3,51	0,14	3,58 - 3,44	15
3	5,76 ^a 5,62 ^b	0,57 0,30	6,04 - 5,47 5,77 - 5,47	54 32
4	1,90	0,10	1,95 - 1,85	12,5
5	6,90	0,20	7,0 - 6,8	22
6	5,37 ^a	0,44	5,59 - 5,15	45
7	4,67	0,16	4,75 - 4,59	18
8	6,07	0,32	6,23 - 5,91	35
9	5,89	0,06	5,92 - 5,86	7
10	4,59	0,05	4,61 - 4,56	6,5
11	5,73	0,27	5,87 - 5,60	9-37
Total		0,23 ^a 0,18 ^b		25% ^a 20% ^b

a: al considerar todas las determinaciones realizadas.

b: sin considerar las determinaciones a partir de un volumen menor a 500 µl.

RESULTADOS

En 10 de los 11 casos estudiados se obtuvo una cuantificación, cuyos rangos fluctuaron entre 2.800 y 6.400.000 copias de ARN/ml. Un caso dio un resultado bajo el límite de detección, en 2 ensayos separados (< de 80 copias/ml). La variación intra-muestra fue en promedio de 0,23 log con un coeficiente de variación de 25% al considerar todas las determinaciones realizadas. Las mayores variaciones se obtuvieron en 3 muestras donde se utilizó un volumen de plasma de 200-300 µl en alguna de las determinaciones, obteniéndose diferencias de 0,27, 0,44 y 0,57 log respectivamente (Tabla 1). Al considerar sólo los resultados obtenidos a partir de un volumen mayor o igual a 500 µl, la precisión fue de 0,18 log (rango de 0,01 log a 0,32 log) y el coeficiente de variación de 20% con un rango de 6 a 37% (Tabla 2). El promedio general de los resultados obtenidos fue de 5,68 log con una desviación standard de 0,098. Se encontró una variación intra-ensayo de 0,24 log

e inter-ensayo de 0,17 log al considerar todas las determinaciones realizadas. Estas variaciones disminuyen significativamente si se compara con los resultados obtenidos a partir de un volumen inicial mayor o igual a 500 µl (0,19 y 0,07 log intra e inter-ensayo, respectivamente). La muestra de plasma en la cual se obtuvo resultados bajo el límite de detección fue analizada en una tercera oportunidad por encontrarse en un ensayo un *background* más alto que pudiera interferir en la lectura final, obteniéndose un resultado de 680 copias ARN/ml (2,83 log).

DISCUSIÓN

Si bien el método de cuantificación comercial Nuclisens HIV-1 QT® presentaba menor difusión en publicaciones científicas al momento de realizarse la evaluación por nuestro laboratorio, nuestra experiencia en su uso nos permite decir que se trata de un método altamente sensible, reproducible y de fácil manipulación para un laboratorio con experiencia en técnicas

de biología molecular. A pesar de las deficiencias metodológicas que pudiera tener este estudio de reproducibilidad, por el escaso número de muestras y las variables introducidas, los resultados obtenidos en un mismo paciente no presentan diferencias significativas en general lo que puede ser considerado un indicador de mayor solidez de este ensayo comercial. Esto último ha sido demostrado por todos los estudios comparativos publicados en los últimos años.^{7-9,11}

Las especificaciones técnicas del ensayo ofrecen la alternativa de trabajar la extracción de ARN en dos modalidades: volumen inicial de 100 µl o de 1.000 µl. Nuestra experiencia permite sugerir el uso de un volumen mayor o igual a 500 µl de plasma a partir de un *buffer* de lisis de 9 ml lo que mejora la reproducibilidad del examen. La precisión del ensayo fue muy buena en general (0,18 log), sin embargo, fue mayor al trabajar con un *input* mayor o igual a 500 µl y con rangos intermedios de carga viral (4,5-5,8 log). La precisión del ensayo fue menor, pero siempre dentro de los rangos aceptados, en aquellas muestras con una carga viral con valores extremos (> 5,8 log ; precisión 0,27 log) que en aquellas con una cuantificación intermedia de ARN (3,0-4,5 log; precisión 0,07 log) lo que concuerda con estudios recientes de este método, donde se describe una buena linealidad entre 2,0 y 6,0 log.²

Existen múltiples estudios comparativos del método NASBA con las otras alternativas comerciales para la cuantificación de VIH-1. En todas ellas se describe el uso de un volumen de plasma menor a 500 µl, lo que explicaría la mayor variación intraensayo encontrada en ellos.³⁻⁵ La excelente reproducibilidad de Nuclisens HIV-1QT®, intra-inter ensayo e interlaboratorios, ha sido reportada recientemente por Segondy et al, a partir de un *input* inicial de 1 ml de plasma.⁶ Considerando que en la actualidad se requiere de exámenes de cuantificación de VIH cada vez más sensibles para evaluar la respuesta al tratamiento antiretroviral, la aplicación de este método a partir de 2 ml de muestra es una excelente alternativa para aumentar la sensibilidad a 40 copias/ml. El uso rutinario de esta metodología en nuestro laboratorio, con muestras de pacien-

tes sometidos a tratamiento antiviral, ha detectado y validado la obtención de valores tan bajos de carga viral de hasta 10 copias por ml, lo cual ha concordado estrechamente con la respuesta clínica e inmunológica. Sin embargo, considerando que la precisión del ensayo disminuye en los rangos cercanos al límite de detección, recomendamos en estos casos una interpretación cuidadosa de los resultados. En nuestro estudio, en sólo una muestra cuyo nivel de ARN fue indetectable, se encontró una diferencia significativa en una de las determinaciones realizadas, correspondiendo probablemente a un resultado falsamente positivo. La especificidad de estos ensayos ha sido previamente reportada (98-100%), lo que no descarta los resultados falsamente positivos inherentes al manejo de laboratorio.^{7,8} Dado que las técnicas de cuantificación han sido desarrolladas para evaluar los niveles de viremia en pacientes infectados con VIH confirmados y no para fines de diagnóstico de la infección, la interpretación de los resultados debe ser siempre en el contexto clínico e inmunológico. Esto cobra especial importancia en los casos de infección vertical, donde se requiere hacer un diagnóstico precoz y el examen de elección debiera ser mediante técnicas de RPC cualitativas.⁸

Desde el punto de vista técnico sería recomendable incorporar rutinariamente controles negativos para la detección de posibles contaminaciones, problema del cual no está exento ninguna técnica ni laboratorio. Desde el punto de vista clínico, la interpretación de un examen de cuantificación que presenta niveles bajos de carga viral (< de 500 copias/ml) debe ser cuidadosa e idealmente confirmada con una determinación en una nueva muestra en un período cercano al primer ensayo.

Es importante recordar que la interpretación de este tipo de exámenes no debe basarse en el número absoluto de copias de ARN informadas sino que debe evaluarse siempre en relación al logaritmo en base 10 de las copias encontradas, ya que se trata de una acumulación exponencial de productos amplificados. Al comparar en un paciente la carga viral en el tiempo, se considera un cambio significativo cuando existe una diferencia mayor a 0,5 log entre dos o más muestras.

Los resultados obtenidos en múltiples estudios comparativos entre los diferentes métodos para la cuantificación de VIH concuerdan en que todas estas técnicas son similares en la capacidad de detectar cambios significativos y presentan una buena correlación entre ellas en la evaluación individual de los pacientes, pero no son comparables entre sí en relación a los niveles de ARN detectados.⁹⁻¹¹ Esto cobra especial importancia si se considera además que el límite inferior de detección (sensibilidad) de los ensayos disponibles es diferente y por lo tanto no todos los resultados "indetectables" significan lo mismo.¹¹ Las primeras generaciones de ensayos de cuantificación para VIH, aún disponibles en el mercado, presentan diferentes niveles de sensibilidad detectando ARN viral a partir de 200-500 copias/ml dependiendo de la técnica. Según los estudios publicados por Murphy et al, estos niveles de sensibilidad dan origen a resultados indetectables hasta en un 46% de las muestras.^{12,13} Afortunadamente, dentro de las alternativas comerciales existentes en nuestro país, además de Nuclisens HIV-1QT®, se han incorporado en los últimos años las versiones mejoradas de las técnicas de Quantiplex HIV RNA® (versión 3.0; Chiron) y Amplicor HIV-1 Monitor® (versión 1.5; Roche Diagnostic Systems) las cuales han aumentado su sensibilidad a 50 copias de ARN/ml, lo cual supera las diferencias previas en los límites inferiores de detección. Considerando que en la actualidad se acepta que la disminución de la replicación viral a niveles de 40-50 copias/ml en plasma es importante en la evaluación de una respuesta al tratamiento antiviral y del desarrollo de resistencia viral, la disponibilidad en Chile de técnicas de última generación, altamente sensibles, es un gran avance para el mejor control de los pacientes infectados con VIH.

Sin embargo, persisten las diferencias en la capacidad de cada una de estas técnicas para detectar niveles altos de carga viral. Los límites superiores descritos son de 50.000, 500.000 y 8.000.000 de copias de ARN/ml para las técnicas Amplicor Monitor (en su modalidad ultrasensible), Quantiplex y Nuclisens, respectivamente. Esto significa que la detección de una disminución significativa en la replicación

del VIH en aquellos pacientes que presentan altos niveles basales de viremia será mejor evaluada mientras mayor sea el rango de cuantificación viral de la técnica utilizada.

Si bien se han descrito factores de corrección para utilizar indistintamente cualquiera de las técnicas descritas, no se recomienda esta modalidad para el seguimiento de pacientes. Primero, debido a que la correlación entre los diferentes ensayos no es lineal y tiende a disminuir en los valores extremos, especialmente con valores menores a 500 copias/ml, donde se describen diferencias de hasta 0,3 log₁₀ al comparar los niveles de ARN de una misma muestra cuantificada por las diferentes técnicas de última generación.¹² Si a esto se suma la precisión de los exámenes y la fluctuación individual de la carga viral de cada paciente en el tiempo, 0,2 log₁₀ en cada caso, fácilmente puede llevar a una mala interpretación clínica del resultado obtenido.

Un adecuado análisis de los resultados de un examen de carga viral debe considerar todos los factores antes descritos para obtener así una correcta interpretación del éxito o fracaso de una respuesta terapéutica. Para ello, el clínico debe disponer de un informe de laboratorio que contenga el resultado de la cuantificación viral expresado en copias/ml y en log en base 10, la metodología utilizada y los rangos de detección de ésta.

Al evaluar las distintas técnicas de cuantificación se tiende a considerar el porcentaje de variación de las cifras absolutas de las copias de ARN. Esto no sería lo más apropiado por comparar metodologías diferentes y amplificación de diferentes moléculas. Lo correcto sería evaluar la precisión y reproducibilidad en base a las diferencias significativas de variaciones en log₁₀ en forma individual para cada uno de ellas. Los resultados de los programas multicéntricos de control de calidad para la cuantificación de VIH demuestran que las discordancias detectadas no dependen del método utilizado sino de la experiencia previa del operador y del laboratorio.^{4,12,13} Por lo tanto, no sólo es importante la correcta elección de la metodología con la cual el clínico evaluará a los pacientes infectados con VIH, sino que debiera considerarse además el laboratorio más confiable por su experiencia.

RESUMEN

La cuantificación (carga viral) del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en los pacientes infectados por este agente ha demostrado ser un valioso examen para la predicción del progreso de la infección y el monitoreo de la respuesta al tratamiento antiviral. Se evaluó la reproducibilidad de la técnica Nuclisens HIV-1 QT®, recientemente introducida en nuestro país, comparando diferentes volúmenes de plasma en 11 pacientes infectados con VIH. Cada muestra fue analizada al menos en duplicado, realizándose un total de 29 determinaciones. Se encontró una mayor reproducibilidad al utilizar un volumen inicial mayor o igual a 500 µl de plasma (precisión promedio de 0,18 log y un coeficiente de variación promedio de 20%). La variación intra e inter-ensayo fue de 0,19 y 0,07 log respectivamente. La buena reproducibilidad encontrada en este estudio, asociada a la facilidad de manipulación de esta metodología en un laboratorio de biología molecular, la hace altamente recomendable para su uso rutinario en el estudio de la carga viral de los pacientes con infección por VIH.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- SAAG M S, HOLODNIY M, KURITZKES D R et al. HIV viral load markers in clinical practice. *Nature Med* 1996; 2: 625-29.
- 2.- NKENGASONG J N, KALOU N, MAURICE CH et al. Comparison of Nuclisens and Amplicor Monitor assays for quantification of Human Immunodeficiency Virus type 1 (HIV) RNA in plasma of persons with HIV-1 subtype A infection in Abidjan, Cote D'Ivoire. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2495-98.
- 3.- COSTE J, MONTES B, REYNES J et al. Comparative evaluation of three assays for the quantification of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA in plasma. *J Med Microbiol* 1996; 50: 293-302.
- 4.- LIN H J, PEDNEAULT L, HOLLINGER F B. Intra-assay performance characteristics of five assays for quantification of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 835-9.
- 5.- REVETS H, MARISSSENS D, DE WIT S et al. Comparative evaluation of NASBA HIV-1 RNA QT, Amplicor-HIV Monitor and Quantiplex HIV RNA assay, three methods for quantification of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1058-64.
- 6.- SEGONDY M, LY T D, LAPEYRE M, MONTES B. Evaluation of the Nuclisens HIV-1 QT assay for quantification of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3372-4.
- 7.- MURPHY D G, COTE L, FAUVEL M, RENE P, VINCELETTE J. Multicenter comparison of Roche Cobas Amplicor Monitor version 1.5, Organon Teknika Nuclisens QT with extractor, and Bayer Quantiplex version 3.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4034-41.
- 8.- HAVLICHEK D H, HAGE-KORBAN. False positive HIV diagnosis by HIV-1 plasma viral load testing. *Ann Intern Med* 1999; 131: 794.
- 9.- VANDAMME A M, SCHMIT J C, VAN DOREN S et al. Quantification of HIV-1 RNA in plasma: comparable results with NASBA HIV-1 RNA QT and the Amplicor HIV Monitor test. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1996; 13: 127-39.
- 10.- SCHUURMAN R, DESCAMPS D, WEVERLING G J et al. Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3016-22.
- 11.- GINOCCHIO C C, TETALI S, WASHBURN D, ZHANG F, KAPLAN M H. Comparison of levels of Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in plasma as measured by the Nuclisens Nucleic Acid Sequence-Based Amplification and Quantiplex Branched-DNA assays. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1210-2.
- 12.- MURPHY D G, GONIN P, FAUVEL M. Reproducibility and performance of the second generation branched-DNA assay in routine quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 812-4.
- 13.- YEN-LIEBERMAN B, BRAMBILLAD, JACKSON B et al. Evaluation of a quality assurance program for quantification of Human Immunodeficiency Virus type 1 RNA in plasma by the AIDS Clinical Trial Group Virology Laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2695-701.

Correspondencia a:
Gabriela Muñoz Gómez
e-mail: gmunoz@ns.hospital.uchile.cl