

# VERIFICACIÓN DEL DESEMPEÑO ANALÍTICO DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE CARGA VIRAL DE VIH M2000 ABBOTT-RT Y COMPARACIÓN CON EL MÉTODO COBAS TAQMAN VIH 2.0 ROCHE

<sup>1</sup>Monteverdi María Laura, <sup>2</sup>Enriqueta Cortiñas, <sup>3</sup>LuccaAndrea

## RESUMEN

**Introducción:** El paciente infectado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) es monitoreado con la cuantificación de la carga viral, siendo uno de los marcadores de la progresión de la enfermedad. El objetivo es verificar el desempeño analítico del método de cuantificación de carga viral de VIH *m2000Abbott Real Time* y realizar la comparación con el método *CobasTaqman HIV 2.0 Roche*. **Materiales y métodos:** estudio descriptivo y observacional, realizado entre abril y julio de 2019. Criterios de inclusión: Pacientes entre 18 y 80 años diagnosticados de VIH, bajo tratamiento y en seguimiento. Criterios de exclusión: embarazadas y niños. La verificación se realizó según: 1-linealidad (CLSI: EP6A porcentaje de no linealidad menor a 50% del Error total aceptable (Eta)), 2-precisión (precisión% de imprecisión aceptable menor al 25 % del Eta), 3-límite de cuantificación (medición del coeficiente de variación (cv); el punto evaluado debe ser inferior a un Eta de distancia del límite declarado por el fabricante y el cv menor al 20%). La comparación se efectuó según el modelo alternativo del protocolo CLSI: EP9A2. Criterio de aceptación: intervalo de confianza del 95% de la ordenada al origen debe contener el 0 y de la pendiente el 1, sesgo aceptable menor al 50 % del Eta. La veracidad (CLIA: EP15 A2 mediante el análisis de materiales de referencia con valores asignados). **Resultados:** se analizaron 40 muestras. 1- Linealidad: pendiente 1,04; ordenada al origen -0,18, porcentaje de no linealidad <10 %. 2-Precisión: 3 log (cv%:4,85%), 4,99 log (cv%1,28%). 3-Límite de cuantificación: fabricante 1,59 log, ensayado: 1,78 (1,64- 1,86), cv%:4,04%. Comparación de ensayos: pendiente: 1,00 (0,98-1,03); ordenada al origen -0,008 (-0,11-0,00), R: 0,9958 (0,9921 – 0,9978). Veracidad: 3 log sesgo 0,60 %, 5 log sesgo 0,67%. **Conclusión:** se verificaron las especificaciones del fabricante y la comparación demostró que el ensayo *m2000AbbottRealTime* puede reemplazar al *CobasTaqman HIV 2.0 Roche* para cuantificar carga viral de VIH.

**Palabras Clave:** VIH-1; carga viral; PCR tiempo real. Verificación. Comparación de métodos.

<sup>1</sup>Bioquímica especialista en Química Clínica. Fundación Para el Progreso de la Medicina. Córdoba - Argentina.

<sup>2</sup>Bioquímica. Fundación Para el Progreso de la Medicina. Córdoba - Argentina.

<sup>3</sup>Dra. En Ciencias Biológicas. Fundación Para el Progreso de la Medicina. Córdoba - Argentina.

✉ María Laura Monteverdi  
[monteverdiml@gmail.com](mailto:monteverdiml@gmail.com)

## BIOQUINFORMA DIGITAL

Publicación on-line del Colegio Profesional de Ciencias Bioquímicas de la Provincia de Córdoba (ISSN: 2344-9926)

BIOQUINFORMA DIGITAL 2021: 1-4.

## INTRODUCCIÓN

La infección por virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son problemas de salud pública en aumento. Según el boletín epidemiológico número 37 “*Respuesta al VIH y a las ITS en la Argentina*”, publicado en diciembre 2020, en Argentina existen 136.000 personas diagnosticadas con VIH y el 17% desconoce su diagnóstico. Entre las personas que conocen su diagnóstico, el 67% recibe asistencia en el sub-

sector público del sistema de salud. Se producen 4800 nuevos contagios de VIH anuales por cada mujer infectada con el virus. El 30,2% del diagnóstico se realiza en una etapa avanzada de la infección<sup>1</sup>.

La determinación cuantitativa de la concentración de VIH en sangre periférica ha contribuido de manera significativa al entendimiento de la patogenia de la infección por VIH y se ha demostrado que es un parámetro importante para el pronóstico y el tratamiento de las personas infectadas por VIH<sup>24</sup>. Las decisiones relativas a iniciación o cambios en el tratamiento antirretrovírico (TAR) se guían por la monitorización de las concentraciones plasmáticas del RNA del VIH (carga viral), el recuento de linfocitos T CD4+ y el estado clínico del paciente. El propósito del TAR es reducir el virus VIH en el plasma por debajo de las concentraciones detectables por los análisis de viremia disponibles<sup>6</sup>.

Con el objeto de agilizar el diagnóstico, ampliar el acceso a los medicamentos antiretrovirales y reducir la mortalidad por causa del SIDA, hace falta optimizar las técnicas de cuantificación de carga viral, el tratamiento oportuno y el seguimiento de la evolución VIH/SIDA.

En la actualidad, se disponen de diferentes pruebas comerciales que permiten cuantificar la carga viral del VIH, con diferencias en sensibilidad, linealidad, sitios blancos en el genoma del virus y métodos de amplificación. Las pruebas más recientes se basan en la metodología de la reacción de polimerasa en cadena (*rt*-PCR) en tiempo real, las cuales han tenido amplia aceptación por parte de los laboratorios por su mayor sensibilidad, rango dinámico más amplio, altos niveles de automatización y mayor capacidad para cuantificar diferentes tipos y subtipos del VIH<sup>2</sup>. El objetivo es verificar del desempeño analítico del método de cuantificación de carga viral *m2000Abbott Real Time* y realizar la comparación el kit *Roche Cobas Taqman HIV 2.0*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: descriptivo y observacional, realizado entre abril y julio de 2019, que incluyó un total de 40 pacientes que concurren al laboratorio FPM con pedido médico de carga viral. La población en estudio estuvo constituida por pacientes entre 18 y 80 años, diagnosticados de VIH, bajo tratamiento y en seguimiento. Se

excluyeron embarazadas y niños. Muestra: se recolectaron tubos con EDTA K3, se separó el plasma después de centrifugar 20 minutos a 1600 g y se congeló a -20°C hasta su procesamiento.

Método: ambas técnicas comerciales son *rt*-PCR cuantitativos en tiempo real para carga viral de VIH. Se utilizaron los equipos *Cobas Taqman de Roche* y *m2000 RT de Abbott*. La verificación de las especificaciones del fabricante de *m2000 Abbott Real time HIV* consistió en evaluar la precisión, veracidad, linealidad, límite de cuantificación y la comparación con el *kit Roche Cobas Taqman HIV 2.0* siguiendo las recomendaciones de las guías del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI)<sup>19</sup>. El requisito de calidad considerado para carga viral de VIH es 0,5 log. El número de muestras se estableció siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Estadounidense de Microbiología (ASM)<sup>20</sup> para la comparación de métodos de biología molecular para pruebas aprobadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (FDA)<sup>21</sup>. Se incluyeron, 8 muestras negativas y 32 muestras positivas; y se cuantificó el ARN del VIH con los 2 ensayos. El procesamiento de las muestras se hizo según recomendaciones del fabricante, para ambos kits comerciales. Se registraron los datos en número de copias/mililitro (copias/ml) y su conversión logarítmica ( $\log_{10}$ ). El nuevo método *m2000Abbott Real time HIV*, se comparó con el método *Roche Cobas Taqman HIV 2.0* utilizado de rutina en el laboratorio.

Análisis estadístico: se realizó utilizando el *software Medcalc*.

## RESULTADOS

Para realizar el análisis de los datos se consideró la recomendación de la ASM<sup>20</sup> para la validación de pruebas diagnósticas de biología molecular para enfermedades infecciosas<sup>3</sup>. Se calcularon medidas de estadística descriptiva, como distribución de frecuencias, media y desviación estándar. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1.

Correlación: se realizó la comparación de métodos según el protocolo EP9-A2<sup>18</sup>. Se elaboró un diagrama de dispersión, análisis de regresión lineal simple, el coeficiente de correlación "r" y la ecuación de la recta. Los resultados de la correlación se muestran en tabla 2. Considerando que el coeficiente de correlación (r) es una medida de la relación lineal entre 2 variables aleatorias; y

varía entre -1 y 1; si  $r=0$  no existe relación; por consiguiente, se asume que en el intervalo de confianza del 95%, la ordenada al origen contiene el 0 y de la pendiente el 1 y el sesgo es menor al 50 % del Eta.

Linealidad: el análisis se realizó según las pautas descritas en la guía EP6-A2<sup>16</sup>. Los resultados se observan en la Figura I. Se tomó como criterio un porcentaje de no linealidad menor al 50% del Eta. Se obtuvo: pendiente de 1,04, ordenada al origen de -0,18 y porcentaje de no linealidad < 10%. La linealidad declarada por el fabricante es de 1,6 a 7 log (c/ml). La linealidad del Abbott real time HIV fue analizada en el rango 1,6 a 6 log (c/ml). EL error sistemático permitido (ESp) es 0,25 log. Se obtuvo un de error 0,085 que fue menor al 10%.

El análisis de la imprecisión se llevó a cabo siguiendo las directrices de la guía EP15A2<sup>17</sup>. Se consideró como criterio: porcentaje de imprecisión aceptable menor al 25 % del Eta y se obtuvo precisión: 3 log (cv %:4,85%), 4,99 log (cv%1,28%).

Considerando que el límite de cuantificación (LC) es la cantidad de analito que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y veracidad aceptable, bajo las condiciones experimentales dadas; el criterio aceptado fue: el cv del punto evaluado debe estar a menos de 1 Eta de distancia del límite declarado por el fabricante y el cv obtenido debe ser menor al 20%. Se realizaron 5 diluciones a log cercano al límite de cuantificación y los resultados se detallan en la tabla 3. Se verificó que el cv obtenido de 4,04% fue menor al 20% y el punto evaluado fue menor a 0,5log.

Teniendo en cuenta que la veracidad representa la proximidad entre la media de un número infinito de valores medidos repetidos y un valor de referencia, se realizó según EP15A2<sup>17</sup> mediante el análisis de materiales de referencia con valores asignados y se obtuvo: veracidad: 3 log sesgo 0,60 %, 5 log sesgo 0, 67%.

## DISCUSIÓN

Los ensayos de cuantificación de ARN plasmáticos de VIH son importantes para el control de pacientes infectados, así como el monitoreo de la respuesta a la terapia antirretroviral<sup>22,26</sup>. Por esta razón, los ensayos comerciales empleados para este propósito deben presentar buena correlación entre sí, para dar lugar al manejo terapéutico apropiado. La carga viral representa el número de partículas

virales circulantes a nivel sanguíneo, puede ser usada para evaluar la dinámica del virus en el organismo en cuanto al estado de la infección, riesgo de progresión y efectividad del tratamiento<sup>9</sup>. Los resultados obtenidos revelan que existe asociación lineal entre ambos métodos de medición. Coeficientes de correlación en un rango de 0,950 a 0,970 han sido reportados por otros autores<sup>6-8</sup>, estas variables estadísticas reflejan que la sensibilidad es similar para ambas técnicas, por lo que, estas metodologías pueden ser intercambiables en el seguimiento de los valores de la carga viral de un paciente infectado con VIH. Otro punto a considerar en las pruebas de detección de carga viral VIH, es la variabilidad biológica (variabilidad aleatoria a corto plazo dentro del sujeto), que en general contribuye hasta  $\pm 0,3 \log_{10}$  (copias/ml) a la variabilidad en los resultados; y la variabilidad de la prueba (variabilidad independiente de la muestra) típicamente contribuye hasta  $\pm 0.2 \log_{10}$  (copias / ml) cuando se evalúa de forma independiente<sup>6,10</sup>. Por lo tanto, pueden hallarse resultados que muestren una variabilidad menor o igual a 0,5  $\log_{10}$ .

Los niveles de variación de VIH RNA en plasma, son estables durante semanas en aquellos pacientes en tratamiento<sup>23,24</sup>. Los cambios ocurridos en los niveles de RNA en plasma mayores a 0,5 log reflejan cambios en los niveles de replicación viral<sup>27</sup>. Una reducción de 1 log en el número de copias de RNA viral por mililitro, luego de iniciado el tratamiento, se asocia con una reducción del 50%-80% en el riesgo relativo de mortalidad asociada al SIDA<sup>25</sup>. Adicionalmente, existen otras fuentes de error que pueden ocasionar resultados discrepantes como la congelación de los tubos, la velocidad de centrifugación inadecuada durante el procesamiento de la muestra; conduciendo a una cuantificación excesiva de RNA viral cuando se utilizan los tubos de preparación de plasma *BD Vacutainer® PPTM*. En estos casos, la cuantificación por exceso puede ser el resultado de una detección del ARN del VIH o del ADN proviral secuestrado dentro de los glóbulos blancos y posiblemente de otros componentes celulares presumiblemente debido a una fuga celular en la barrera del gel debido a una manipulación incorrecta. En consecuencia, el procesamiento de las muestras en los tubos son pasos importantes a tener en cuenta al evaluar y resolver discrepancias en los resultados de las pruebas de carga viral<sup>3</sup>. Al respecto, es necesario

ser cautelosos en la interpretación de la significancia clínica de los resultados individuales de carga viral en el rango superior de las técnicas. Se sugiere evaluar los resultados obtenidos para cada caso, antes de proceder a realizar la intensificación del tratamiento o cambios en las decisiones terapéuticas. Si bien se considera como limitación del trabajo el empleo de guías del CLSI que actualmente han sido reemplazadas por las versiones EP15A3 y EP9c, no afectaría la validez de los resultados obtenidos, ya que se tuvieron en cuenta los requisitos recomendados por la ASM, los criterios definidos por el fabricante y la validación de los resultados de acuerdo al uso previsto establecidos según los criterios de calidad del laboratorio.

## CONCLUSIÓN

La comparación de los valores de carga viral obtenidos por las técnicas evaluadas, demostraron una relación lineal en el intervalo analizado. Por lo que se concluye que ambas técnicas de medición del número de copias de ARN del VIH son comparables y pueden utilizarse para monitorear la respuesta a los tratamientos antirretrovirales evaluando así el curso clínico desde el inicio.

Se recomienda que la confirmación de los niveles plasmáticos del ARN viral se efectúe en el mismo laboratorio y con el empleo de una misma técnica para determinación de carga viral en el seguimiento de los pacientes infectados, para dar lugar al manejo terapéutico apropiado.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del laboratorio de la Fundación para el Progreso de la Medicina.

## CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Boletín sobre el VIH, SIDA e ITS en la Argentina N° 37. Respuesta al VIH y las ITS en la Argentina Año XXIII, diciembre de 2020, Presidencia de la Nación Argentina.
2. Salimnia H, Moore EC, Crane LR, Macarthur RD, Fairfax MR. Discordance between viral loads determined by Roche COBAS

AMPLICOR human immunodeficiency virus type 1 monitor (version 1.5) standard and ultrasensitive tests caused by freezing patient plasma in centrifuged Becton-Dickinson Vacutainer brand plasma preparation tubes. *J Clin. Microbiol.* 2005; 43:4635–39.

3. Burd E. Validation of laboratory developed molecular assays for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010; 23:570-6.

4. Henrich TJ, Wood BR, Kuritzkes DR. Increased Risk of Virologic Rebound in Patients on Antiviral Therapy with a Detectable HIV Load 48 copies/mL. 2012; 7(11).

5. Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, van der Vliet R, Babiak R. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J Clin. Virol.* 2007; 38(4):304-12.

6. Cobb BR, Vaks JE, Do T, Vilchez RA. Evolution in the sensitivity of quantitative HIV-1 viral load tests. *J Clin Virol.* 2011; 52: 77–82.

7. Gutiérrez C, Pacheco M, Sánchez D, Ameli G, Moncada M, Chacón E. Comparación de dos métodos comerciales para determinación de carga viral en plasmas provenientes de pacientes venezolanos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). *Rev. Panam. Infectol.* 2009; 11 (2): 44-49.

8. Pan P, Tao X, Zhang Q, Xing W, Sun X, Pei L, et al. Clinical comparison of branched DNA and reverse transcriptase-PCR and nucleic acid sequence-based amplification assay for the quantitation of circulating recombinant form<sub>BC</sub> HIV-1 RNA in plasma. *AIDS.* 2007; 21: 27–32.

9. Gallart, J.E. Strategies for long-term success in the treatment of HIV infection. *JAMA.* 2000; 283: 1329-34.

10. Schumacher W, Frick E, Kauselmann M, Maier-Hoyle V, Van der Vliet R, Babiak R. Fully automated quantification of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 RNA in human plasma by the COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan system. *J. Clin. Virol.* 2007; 38(4):304-12.

11. Tung YC, Ke LY, Lu PL, Lin KH, Lee SC, Lin YY, et al. Comparison of the Roche COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HIV-1 test v1.0 with v2.0 in HIV-1 viral load quantification. *Kaohsiung J Med Scien.* 2015 Apr; 31(4):188-93

12. Braun P, Delgado R, Drago M, Fanti D, Fleury H, Hofmann J, et al. A European multicenter study on the comparison HIV-1 viral loads between VERISHIV-1 Assay and

Roche COBAS® TAQMAN® HIV-1 test, Abbott RealTimeHIV-1 Assay, and Siemens VERSANT HIV-1 Assay. *J Clin. Virol.* 2017 Jul; 92:75-82.

13. Nkeze J, Liang D, Adkins H, Zhao RY. Comparison of HIV-1 Viral Load between Abbott m2000 and Roche COBAS TaqMan Methods. *J Antivir. Antiretrovir.* 2010. 2: 42-45.

14. Aguilera A, González Alba M.J, Martínez Lamas L, Moldes Suárez M.L. y Galán J.C. Evaluación crítica de los nuevos métodos comerciales para la determinación de la carga viral de VIH-1 y del VHC. 2010; 28(1):62-67.

15. Jordan JA, Plantier JC, Templeton K, Wu AHB. Multi-site clinical evaluation of the Xpert HIV-1 viral load assay. *J Clin. Virol.* 80:27–32.2018.

16. CLSI publication EP6-A2. Evaluation of the linearity of quantitative measurement procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline (ISBN 1-56238-498-8) Volume 23 Number 16, 2003

17. CLSI publication EP15-A2. User verification of performance for precision and trueness; Approved Guideline. Second Edition (ISBN 1-56238-574-7) Volume 25 Number 17, 2006.

18. CLSI publication EP9-A2. Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline - Second Edition (ISBN 1-56238-472-4). Volume 25 Number 17, 2002.

19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), <https://clsi.org/>

20. American Society for Microbiology(AMS), <https://asm.org/>

21. Food and Drug Administration (FDA), <https://www.fda.gov/>

22. Liu Y, Sigel KM, Westra W, Gitman MR, Zheng W, Gaisa MM. Pacientes infectados por VIH con precursores de cáncer anal: características clínico-patológicas y distribución de subtipos de virus del papiloma humano. 2020; 63 (7): 890-896.

23. Tan NK, Carrington D, Pope CFJ. Verificación de los protocolos Roche cobas 6800 PCR 200 y 500 I para la cuantificación de ARN VIH-1, ADN VHB y ARN VHC y evaluación con ensayos COBAS Ampliprep / COBAS TaqMan. *Med Microbiol.* 2018, 67 (12): 1711-1717.

24. Adams P, Vancutsem E, Nicolaizeau C, Servais JY, Piérard D, François JH, et al. Evaluación multicéntrica de la prueba cuantitativa de ácidos nucleicos cobas HIV-1 para su uso en el sistema

cobas 4800 para la cuantificación de la carga viral plasmática del VIH -1 *Clin Virol.* 2019, 114, 43-49.

25. Hatzakis A, Papachristou H, Nair SJ, Fortunko J, Foote T, Kim H, et al. Características analíticas y evaluación comparativa del ensayo Aptima HIV-1 QuantDx con Ampliprep / COBAS TaqMan HIV-1 test v2.0. *Worlock AJ. Virol J.* 2016; 13 (1): 176.

26. Wirden M, Larrouy L, Mahjoub N, Todesco E, Damond F, Delagreverie H. Comparación multicéntrica del nuevo sistema Cobas 6800 con Cobas Ampliprep / Cobas TaqMan y Abbott RealTime para la cuantificación de carga viral de VIH, VHB y VHC. *Clin Virol.* 2017; 96: 49-53.

27. Duncan D, Duncan J, Kramer B, Nilsson AY, Haile B, Butcher A. Un algoritmo de prueba de diagnóstico de VIH que utiliza el ensayo cualitativo Cobas VIH-1/VIH-2 para la diferenciación y confirmación del tipo de VIH. *Clin. Microbiol.* 2021; 59 (7): e0303020.

## Materiales Gráficos

**Tabla 1:** Resultados obtenidos

<b>N:40</b>	<b>Roche Cobas Taqman HIV 2.0.</b>	<b>Abbott Real Time HIV</b>
<b>Rango de referencia (log)</b>	1,5 a 7	1,6 a 7
<b>Media (log)</b>	4,04	4,07
<b>DS (log)</b>	1,37	1,32
<b>IC (95%)</b>	3,54 - 4,53	3,60 - 4,55
<b>cv (%)</b>	34,04	32,47

**N:** número de muestras, **DS:** desvío estándar, **IC:** intervalo de confianza, **cv:** coeficiente de variación

**Tabla 2:** Resultados de la comparación de métodos.

<b>Pendiente</b>	1,00 (0,98-1,03)
<b>Ordenada al origen</b>	-0,008 (-0,11-0,00)
<b>r</b>	0,9958(0.9921 – 0.9978)
<b>p</b>	menor 0,0001
<b>Bias</b>	0,028 (menor a 0,25 log)

**r:** coeficiente de correlación, **p:** probabilidad,

**Bias:** cuantificación del error sistemático del laboratorio

**Tabla 3:** Resultados de la verificación del límite de cuantificación.

<b>Límite de cuantificación del fabricante</b>	1,59 log (39 c/ml)- IC del 95%
<b>Límite de cuantificación ensayado</b>	promedio log: 1,78 (1,64-1,86), cv: 4,04 %

**Figura I:** Resultados de la verificación de la linealidad.