

Carta al Director

Maria Gil-Fortuño
Maria Dolores Tirado-
Balaguer
Susana Sabater-Vidal
Bárbara Gomila-Sard
Rosario Moreno-Muñoz

Influencia de la fase preanalítica en la cuantificación de la carga viral: aprendiendo de la experiencia

Servicio de Microbiología, Hospital General Universitari de Castelló. Castelló de La Plana.

Sr. Editor: La cuantificación del virus de la hepatitis C (VHC), de la hepatitis B (VHB) y del virus de la inmunodeficiencia humana-1 (VIH-1) supone un elevado volumen de trabajo para los laboratorios de Microbiología, ya que los protocolos científicos exigen un seguimiento cada vez más estrecho de los pacientes para valorar la eficacia y duración de los nuevos tratamientos. El manejo adecuado de las muestras antes del procesamiento es fundamental para la precisión de los resultados. Aunque el procedimiento de referencia sería congelar el plasma a -70°C en alícuotas inmediatamente después de centrifugar los tubos, la rutina diaria no siempre lo permite. El tubo BD Vacutainer Plasma Preparation Tube-PPT™ (con K2 EDTA vaporizado y un gel que separa las fracciones celular y plasmática), prácticamente ha reemplazado al EDTA convencional, que precisa de una separación del plasma en las 6h posteriores a la extracción para evitar la degradación del ARN. Según el fabricante, el PPT™ permite conservar la muestra sin centrifugar un máximo de 6h a temperatura ambiente (TA) y, una vez centrifugada, 24h a TA, 5 días a 4°C o más días de -20 a -70°C ¹.

A nuestro servicio llegan muestras de consultas externas del hospital, o del resto de hospitales de la provincia y del Centro Penitenciario, que recibimos ya centrifugadas. Hasta octubre de 2016 separábamos alícuotas que se rotulaban a mano y se congelaban a -20°C . A partir de entonces comenzamos emplear el sistema semi-automatizado de gestión de muestras Indexor™ (iSens-Electrónica Lda, Porto, Portugal), que habíamos implantado unos meses antes en la sección de Serología con muy buen resultado. Indexor™ permite localizar las muestras por listas de trabajo o número, y almacenarlas a largo plazo. El tiempo que ahorra al personal técnico ha sido analizado recientemente². Además de agilizar el flujo de trabajo supone una mejora en la

calidad y seguridad del paciente. Decidimos introducirlo en la sección de Molecular para evitar tanto errores en la identificación como riesgos para el personal técnico derivados de la manipulación de los tubos. Tras modificar nuestra rutina comprobamos que los valores no discreparan respecto a los esperados. Esto fue así para el VHC y el VHB, pero no para el VIH-1 que analizamos por Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan (Roche®). En un mismo ensayo, en varios pacientes con antecedentes de carga viral (CV) indetectable o menor de 20 Copias/mL obteníamos valores de hasta 3 log₁₀, demasiado elevados para considerarse *blips* y que podrían tener implicaciones clínicas, induciendo incluso a pensar en un fracaso terapéutico. Descartada una contaminación del AmpliPrep, un problema del lote de reactivo o un error en algún algoritmo de cálculo de la técnica, el único cambio en nuestra rutina había sido mantener los tubos PPT™ refrigerados en gradillas Indexor™ hasta su procesamiento.

Tras revisar la literatura, varios estudios³⁻⁵ no encontraron diferencias significativas en la cuantificación del VIH-1 y VHC al comparar el procesamiento en distintas condiciones. Pero algunos autores⁶ referían cargas mayores con plasma congelado *in situ* en tubos PPT™, atribuyéndolo a que tras la congelación se podría liberar material genético no particulado de células incluidas en el gel o debajo de él. Roche® emplea tecnología basada en la transcriptasa inversa, que extrae y amplifica tanto ADN como ARN, y parece que una sola partícula de ADN proviral de VIH-1 podría elevar la carga viral hasta en 200 copias⁷. Esto no ocurre con el ensayo Abbott RealTime HIV-1® presumiblemente porque se extrae únicamente ARN. De hecho, en estudios comparativos de ambas técnicas, las cargas obtenidas con Abbott® son menores^{8,9}. Cloherty et al⁸ reflejan hasta un 74% de muestras con diferencias $>0,5$ log₁₀ copias/mL, más de la mitad de las cuales eran detectables por Roche® e indetectables por Abbott® y en las que utilizando dos nested RT-PCR no se detectó ARN. Así pues se desaconseja la congelación *in situ* por este motivo si las cargas se procesan con Roche®. En el caso de PPT™ refrigerado (como en nuestro caso), no hemos encontrado una explicación en la literatura.

Correspondencia:
Maria Gil-Fortuño
Servicio de Microbiología
Hospital General Universitari de Castelló. Avenida Benicàssim sn, 12004. Castelló de La Plana
Tfno.: 964 725102
E-mail: gil_marfor@gva.es

Además de la temperatura existe otro condicionante: se han notificado elevaciones de la carga de VIH-1 (de pacientes bajo terapia antirretroviral efectiva) en plasma tomado en tubo PPT™ respecto al tubo EDTA convencional, presumiblemente debidas a que, tras el transporte de los tubos, se liberan partículas de VIH-1 asociadas a células. Esto puede resolverse con una centrifugación adicional pre-ensayo^{10,11}. Adoptando esta medida nosotros hemos obtenido resultados concordantes con los antecedentes, por lo que parece que no sería indispensable la congelación inmediata del plasma. En la actualización de la ficha técnica del tubo PPT™¹ ya se incluye esta recomendación, junto con otras para que los valores de la CV de VIH-1 analizada por Roche® sean comparables a los obtenidos con el tubo EDTA: *mantener la muestra sin centrifugar en PPT un máximo de 6h a TA; mantener el plasma en el tubo PTT <24h a TA o 5 días a 4°C; y volver a centrifugar 5 minutos a 600g antes del análisis.*

En el insert de Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test® (revisión de 2015)¹² aparece que *la técnica se ha validado para su uso con plasma humano recogido en anticoagulante EDTA únicamente, y que la realización de la prueba en otros tipos de muestras puede dar lugar a resultados inexactos.* Dado que la mayoría de laboratorios trabaja con tubos PPT™ sería interesante que en la ficha técnica de constaran las especificaciones particulares para ellos. Además, como sugieren Bonner et al¹³ en países con menos recursos donde, por problemas de logística, en ocasiones no pueden ni siquiera refrigerarse las muestras serían necesarios más estudios comparativos a condiciones límite para facilitar a las poblaciones desfavorecidas el control de la viremia.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Roque J. Esteban, de Roche, y a José Miguel Molina y M^a Dolores Gómez, del Hospital La Fe, su apoyo mientras solucionamos el problema.

FINANCIACIÓN

Las autoras declaran no haber recibido financiación para la realización de este estudio.

CONFLICTO DE INTERESES

Las autoras declaran no tener ningún conflicto de intereses

BIBLIOGRAFÍA

- Vacutainer® PPT™ Plasma Preparation Tube For the Preparation of Undiluted Plasma for use with Molecular Diagnostic Test Methods. VDP40162-WEB-03. March 2016.
- Coskun A, Serteser M, Altinayak R, Unsal I. Evaluation of the performance of INDEXOR® in the archive unit of a clinical laboratory: a step to Lean Laboratory. Clin Chem Lab Med 2016, 0427.
- Bernal-Soriano MC, Gimeno A, Sánchez-Paya, J, Portilla J. Influencia de la conservación de la muestra en la cuantificación del ARN viral de la hepatitis C. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34:685-90.
- Holodniy M, Rainen L, Herman S, Yen-Lieberman B. Stability of Plasma Human Immunodeficiency Virus Load in Vacutainer PPT Plasma Preparation Tubes during Overnight Shipment. J Clin Microbiol 2000; 38:323-6.
- Fernandes H, Morosyuk S, Abravaya K, Rmanathan M, Rainen L. Evaluation of effect of Specimenhandling parameters for plasma preparation tubes on viral load measurements obtained by using the Abbott RealTime HIV-1 load assay. J Clin Microbiol 2010; 48:2464-8.
- García-Bujalance S et al. Elevation of viral load by PCR and use of plasma preparation tubes for quantification of human immunodeficiency virus type 1. J Mi Met 2007; 69:384-6.
- 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 Assays Caused by Freezing Patient Plasma in Centrifuged Becton-Dickinson Vacutainer Brand Plasma Preparation Tubes. J Clin Microbiol 2005; 43:4635-9.
- Cloherly G et al. Clinical implications of elevated HIV-1 viral load results obtained from samples stored frozen in vacutainer plasma preparation tubes. J Viro Met 2014; 204:91-2.
- Van Rensburg EJ, Tait K, Watt A, Schall R. Comparative evaluation of the Roche Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Version 2 test using the TaqMan 48 Analyzer and the Abbott RealTime HIV-1 assay. J Clin Microbiol 2011; 49:377-9.
- Wan H, Seth A, Rainen L, Fernandes H. Coamplification of HIV-1 Proviral DNA and Viral RNA in Assays Used for Quantification of HIV-1 RNA. J Clin Microbiol 2010; 48: 2186-90.
- Kran A-MB, Jonassen TØ, Sannes M, Jakobsen K, Lind A, Mæland A, Holberg-Petersen M Overestimation of HIV-1 viral load caused by cells in plasma for plasma preparation tubes. J Clin Micro 2009, 47: 2170-4.
- Roche Molecular Systems. Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan HIV-1 Test, version 2.0. package insert 12/2015. Doc Rev 14.0.
- Bonner K et al. Expanding Access to HIV Viral Load Testing: A Systematic Review of RNA Stability in EDTA Tubes and PPT beyond Current Time and Temperature Thresholds. PLoS One 2014, 9 (12).