

-----Antiviral Therapy 13 Suppl 2:49–57-----

# Estrategia de Laboratorios para la Farmacorresistencia de la Organización Mundial de la Salud/HIVResNet

*Silvia Bertagnolio<sup>1</sup>\*, Inge Derdelinckx<sup>2</sup>, Monica Parker<sup>3</sup>, Joseph Fitzgibbon<sup>4</sup>, Herve Fleury<sup>5</sup>, Martin Peeters<sup>6</sup>, Rob Schuurman<sup>3</sup>, Deenan Pillay<sup>7</sup>, Lynn Morris<sup>8</sup>, Amilcar Tanuri<sup>9</sup>, Guy-Michel Gershy-Damet<sup>10</sup>, John Nkengasong<sup>11</sup>, Charles F Gilks<sup>1</sup>, Donald Sutherland<sup>1</sup> y Paul Sandstrom<sup>12</sup>*

<sup>1</sup>Organización Mundial de la Salud, Departamento de VIH, Ginebra, Suiza

<sup>2</sup>University Medical Center, Department of Virology, Utrecht, Países Bajos

<sup>3</sup>David Axelrod Institute, NYS Department of Health, Albany, Nueva York, Estados Unidos

<sup>4</sup>DHHS/NIH/NIAID/DAIDS/TRP/DDCSB, Bethesda, Estados Unidos

<sup>5</sup>Laboratoire de Virologie, Hôpital Pellegrin, Bordeaux, Francia

<sup>6</sup>Programme SIDA/IRD- Laboratoire Retrovirus, Montpellier, Francia

<sup>7</sup>Centre for Infections, Health Protection Agency Colindale, Londres, Reino Unido

<sup>8</sup>National Institute for Communicable Diseases, HIV/AIDS Unit, Johannesburgo, Sudáfrica

<sup>9</sup>Laboratorio de Virologia Molecular, Cidade Universitaria, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>10</sup>Organización Mundial de la Salud, Oficina Regional de la OMS para África, Ouagadougou, Burkina Faso

<sup>11</sup>Global AIDS Programme, Centers for Disease Control, Atlanta, Estados Unidos

<sup>12</sup>National HIV and Retrovirology Laboratories, Public Health Agency of Canada, Ottawa, Canadá

\*Correo-e del autor responsable de la correspondencia: bertagnolios@who.int

---

El rápido incremento del acceso a medicamentos antirretrovirales a escala mundial ha hecho que la farmacorresistencia del VIH (FR-VIH) se haya convertido en una importante cuestión de salud pública. Esto exige una respuesta coordinada y colectiva tanto a escala nacional como internacional a fin de evaluar el alcance de la FR-VIH y el establecimiento de estrategias eficaces fundamentadas en pruebas científicas para minimizar su aparición y transmisión. Al mismo tiempo que despliegan sus esfuerzos para ofrecer un acceso universal al tratamiento del VIH, los países están estableciendo protocolos basados en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para medir, a nivel poblacional, tanto la FR-VIH transmitida como la FR-VIH que aparece durante el tratamiento. La OMS, en colaboración con expertos internacionales (Grupo de Trabajo de Laboratorio de la HIVResNet), ha elaborado una estrategia de laboratorios, cuyo objetivo principal es proporcionar resultados genotípicos del VIH de calidad garantizada para las muestras procedentes de las encuestas de FR-VIH. Los resultados se utilizarán para ayudar a controlar la aparición y propagación de la farmacorresistencia, y orientar a los responsables de tomar decisiones sobre políticas relativas a los tratamientos antirretrovirales a nivel nacional, regional y mundial. La Estrategia de Laboratorios para la FR-VIH elaborada por la OMS incluye varios aspectos clave: la formación de una red mundial de laboratorios nacionales, regionales y especializados acreditados para realizar pruebas de FR-VIH utilizando un conjunto común de normas e indicadores de desempeño de la OMS; recomendaciones sobre métodos aceptables para obtener, manipular, enviar y almacenar las muestras en condiciones de trabajo sobre el terreno; y la prestación de servicios de apoyo técnico de laboratorio, desarrollo de capacidades y control de la calidad para los laboratorios de la red. La Red de Laboratorios de FR-VIH de la OMS/HIVResNet ha sido concebida inspirándose en otras redes de laboratorios exitosas coordinadas por la OMS. En agosto de 2007, se había realizado la evaluación de acreditación en 30 laboratorios, repartidos por las Regiones de África, Asia Sudoriental, Pacífico Occidental y el Caribe de la OMS.

---

## Introducción

La Organización Mundial de la Salud (OMS) promueve un enfoque de salud pública [1] para la ampliación del acceso al tratamiento antirretroviral (TARV). Como resultado de ello, la OMS, con la contribución técnica de la HIVResNet (Red Mundial de Vigilancia de la Farmacorresistencia del VIH), ha elaborado una Estrategia Mundial de Prevención y Evaluación de la Farmacorresistencia del VIH (FR-VIH) [2]. La HIVResNet es un grupo integrado por más de 50 expertos internacionales en FR-VIH, afiliados con universidades, laboratorios, organizaciones internacionales y organismos sin fines de lucro. La finalidad general de la estrategia mundial es apoyar la planificación a nivel nacional de prácticas para el programa de TARV, minimizar la aparición de la FR-VIH y limitar el grado en que la resistencia pone en peligro la eficacia de los regímenes terapéuticos estándar recomendados de TARV de primera y segunda línea disponibles en numerosos entornos con recursos limitados. En el marco de esta Estrategia Mundial de FR-VIH, la OMS y el Grupo de Trabajo de Laboratorio de la HIVResNet han elaborado la Estrategia de Laboratorios para la FR-VIH.

## Estrategia de Laboratorios para la FR-VIH de la OMS/HIVResNet

El laboratorio de virología desempeña un papel fundamental en las encuestas de FR-VIH. La identificación de la FR-VIH se puede determinar fenotípicamente, mediante pruebas de cultivo celular, y genotípicamente, mediante análisis secuencial del ADN de las regiones de codificación de la transcriptasa inversa y la proteasa. La genotipificación identifica las mutaciones asociadas con una menor susceptibilidad a uno o más medicamentos antirretrovirales o incluso a clases enteras de antirretrovirales. Este análisis genético también puede proporcionar información sobre el subtipo VIH-1, aunque no ofrece suficientes datos para caracterizar correctamente algunas formas recombinantes.

Las pruebas genotípicas para detectar la farmacorresistencia se utilizan de forma generalizada para fines clínicos y de vigilancia en países desarrollados y es la técnica recomendada por la OMS para la ampliación de las encuestas sobre FR-VIH basadas en la población. No obstante, la falta de normas comunes para el control de la calidad sigue siendo un obstáculo para que los distintos laboratorios puedan generar resultados comparables y fiables. Por otra parte, la escasez de infraestructura de laboratorio básica, así como el costo y la complejidad asociados con las pruebas genotípicas, han limitado la creación de laboratorios de genotipificación en entornos con recursos limitados.

El objetivo general de la estrategia de laboratorios para la FR-VIH es apoyar las encuestas de FR-VIH recomendadas por la OMS facilitando la provisión en tiempo oportuno de resultados de genotipificación de calidad garantizada mediante el establecimiento de una Red Mundial de Laboratorios de la OMS/HIVResNet que ofrezca a todos los países que adopten la estrategia de la OMS relativa a las encuestas nacionales de FR-VIH acceso a servicios de laboratorio de genotipificación de calidad asegurada acreditados por la OMS, y la elaboración de directrices sobre métodos adecuados para la obtención, manipulación, envío, almacenamiento y análisis de muestras para determinar la FR-VIH.

## Red Mundial de Laboratorios de la OMS/HIVResNet

La Red Mundial de Laboratorios de la OMS/HIVResNet incluye laboratorios a escala nacional, regional y mundial que han obtenido la acreditación de la OMS para realizar pruebas de FR-VIH.

Existen numerosas restricciones al establecimiento de la red en países de ingresos bajos y medianos, en particular con relación a la disponibilidad de recursos, la idoneidad de la infraestructura y el acceso a una formación adecuada. Estos factores se han tenido en cuenta a la hora de elaborar la Estrategia de Laboratorios de la OMS/HIVResNet a fin de asegurar su implementación eficaz en ese tipo de entornos.

Cabe notar que ya existen otras redes de laboratorios de FR-VIH en ese ámbito. No obstante, las redes existentes han sido establecidas para apoyar proyectos de investigación específicos, para proporcionar resultados clínicos, o con ambos objetivos. La Red de Laboratorios de la OMS/HIVResNet es la primera que se establece con el propósito de salud pública de apoyar las encuestas de FR-VIH recomendadas por la OMS [2].

El funcionamiento de la red se basa en los modelos exitosos de otras redes de laboratorios coordinadas por la OMS, como la Red Mundial de Laboratorios sobre la Poliomielitis [3,4], la Red de Laboratorios de Sarampión y Rubéola [5,6], la Red Mundial de Laboratorios del Virus del Papiloma Humano [7], la Red de Laboratorios de Gripe [8] y la Red de Laboratorios de Tuberculosis [9]. El programa para la gripe apoyado por la Red de Laboratorios de Gripe fue establecido entre 1948 y 1952, siendo uno de sus elementos centrales las recomendaciones anuales relativas a la composición de las vacunas contra la gripe y actividades conexas, así como un mecanismo mundial de alerta para la aparición de virus de la gripe con un potencial pandémico [7]. La Red de Laboratorios de Tuberculosis se estableció formalmente en 1994 [8] como una red de garantía de la calidad para las pruebas de susceptibilidad a medicamentos. La Red de Laboratorios para la Poliomielitis se puso en marcha en 1986 en las Américas [3], y en 2001 contaba con 147 laboratorios a escala mundial.

La Red de Laboratorios de la OMS/HIVResNet se basa en la misma estructura piramidal característica de las otras redes de laboratorios de la OMS, que permite que existan distintas categorías de miembros según las capacidades disponibles y responsabilidades. Los laboratorios individuales, dependiendo de su capacidad y conocimientos técnicos, deben desempeñar ciertas funciones específicas en apoyo de las necesidades nacionales, regionales y mundiales de la red. La red mundial se organiza en tres niveles: laboratorios nacionales de farmacorresistencia, laboratorios regionales de farmacorresistencia y laboratorios mundiales especializados de farmacorresistencia.

Todas las encuestas nacionales de FR-VIH de la OMS exigen la realización de las pruebas en un laboratorio acreditado por la OMS. El proceso de acreditación de la OMS se pone en marcha solamente para los laboratorios designados por las autoridades nacionales para realizar pruebas de muestras recogidas en el marco de las encuestas de FR-VIH recomendadas por la OMS. Por lo general, la OMS sólo acredita un laboratorio por país. No obstante, el número de laboratorios acreditados varía dependiendo del tamaño del país, la población, la prevalencia del VIH, el número de pacientes que reciben TARV, las capacidades existentes en materia de

genotipificación del VIH y los recursos disponibles en cada país. Los países con capacidades de laboratorio limitadas y que centran sus esfuerzos en ampliar las pruebas de laboratorio diagnósticas y clínicas, como las pruebas del VIH y el recuento de linfocitos CD4, pueden decidir enviar sus muestras para las encuestas de FR-VIH a un laboratorio acreditado a nivel regional. Los países populosos que ya tienen capacidades para realizar pruebas de FR-VIH pueden solicitar la acreditación de más de un laboratorio nacional, puesto que probablemente el gran volumen de muestras para las encuestas de FR-VIH supere la capacidad de un solo laboratorio.

La acreditación de un segundo laboratorio nacional puede resultar necesaria también cuando sea difícil transportar las muestras desde diferentes áreas del país a un solo laboratorio.

### **Tareas y responsabilidades de los laboratorios de la red**

La principal tarea de los laboratorios acreditados por la OMS es proporcionar resultados genotípicos de calidad asegurada, pertinentes para los programas nacionales de TARV, y apoyar un enfoque de salud pública en materia de TARV.

#### ***Laboratorios nacionales de farmacorresistencia***

A fin de ser evaluado y recibir la acreditación de la OMS, los laboratorios nacionales deben ser designados por sus respectivas autoridades nacionales de salud pública a fin de asegurar la eficacia de la red a escala nacional. La tarea de los laboratorios nacionales de farmacorresistencia es genotipificar las muestras obtenidas en el marco de las encuestas de FR-VIH y aportar, de forma oportuna, datos precisos de secuencias del VIH a una base de datos sobre FR-VIH de alcance nacional. En caso de que un país no disponga de las capacidades para realizar pruebas de FR-VIH en un laboratorio nacional, puede decidir enviar las muestras obtenidas en el marco de la encuesta de FR-VIH a un laboratorio regional o especializado acreditado por la OMS. Se espera que los programas nacionales sobre el SIDA apoyen las encuestas de FR-VIH, incluidas las pruebas de laboratorio, con sus propios fondos o con financiamiento de donantes.

#### ***Laboratorios regionales de farmacorresistencia***

Cada región de la OMS (África, Pacífico Occidental, Asia Sudoriental, Mediterráneo Oriental y América Latina y el Caribe) contará con uno o más laboratorios regionales, dependiendo del volumen de muestras que deban ser analizadas en esa región. En función del número de países que realicen las encuestas de FR-VIH de la OMS en una determinada región, puede que sea necesario disponer de un mayor número de laboratorios regionales. Los laboratorios regionales son “centros de excelencia” en cada región y pueden asumir responsabilidades internacionales. Actúan como centros de referencia para la realización de pruebas de FR-VIH a fin de facilitar las encuestas de FR-VIH en los países de su región que no cuenten con un laboratorio nacional de farmacorresistencia acreditado. Además, los laboratorios regionales de farmacorresistencia tienen las siguientes responsabilidades: facilitar la formación, educación y capacitación del personal de laboratorio de los laboratorios nacionales de farmacorresistencia de la región; ayudar a la OMS en la evaluación de los laboratorios nacionales de farmacorresistencia candidatos de la región correspondiente y ofrecer asistencia técnica cuando sea necesario; y contribuir a la

organización de las reuniones regionales de la Red de Laboratorios de la OMS/HIVResNet, que ofrecen formación, oportunidades de debatir cuestiones relativas a la elaboración de programas y actualizaciones sobre nuevas metodologías.

### ***Laboratorios especializados de farmacorresistencia***

La OMS identifica laboratorios especializados de farmacorresistencia teniendo en cuenta varios criterios, entre otros: experiencia en el ámbito de la FR-VIH reconocida a escala internacional; experiencia como laboratorio de FR-VIH en materia de salud pública, aplicaciones clínicas o investigación; conocimientos especializados reconocidos en una serie de temas de investigación clave de importancia en el ámbito de la salud pública; y la capacidad, recursos, compromiso y motivación del laboratorio.

Aunque se pueda recurrir a los servicios de los laboratorios especializados de farmacorresistencia para proporcionar pruebas de FR-VIH a países que no están cubiertos por laboratorios nacionales o regionales de farmacorresistencia, la principal función de los laboratorios especializados es establecer normas y ofrecer apoyo y asistencia técnica a los laboratorios regionales y nacionales de farmacorresistencia. Los laboratorios especializados de farmacorresistencia deben ser competentes en tecnologías de genotipificación tanto comerciales como no comerciales, y son responsables de ciertas funciones específicas dentro de la red (véase Cuadro 1).

Aunque los laboratorios especializados de farmacorresistencia, los laboratorios regionales de farmacorresistencia y los gobiernos anfitriones asumen gran parte de la responsabilidad financiera de su trabajo en colaboración con la Red de Laboratorios de la HIVResNet, la OMS examinará la posibilidad de financiar o cofinanciar varios aspectos, según sea necesario: la visita inicial de evaluación del laboratorio, incluido el desplazamiento y viáticos de un experto de laboratorio identificado dentro de la red para que inspeccione los laboratorios nacionales, regionales y especializados de farmacorresistencia candidatos; tras la evaluación inicial del laboratorio, visitas para la prestación de asistencia técnica; el envío y análisis de pruebas de competencia a laboratorios candidatos y laboratorios nacionales, regionales y especializados de farmacorresistencia acreditados para el programa de garantía de la calidad, por lo menos en la etapa inicial de establecimiento de la red mundial; e investigaciones operacionales que sean pertinentes para los objetivos de la estrategia de la OMS.

---

#### **Cuadro 1. Funciones específicas de los laboratorios especializados de farmacorresistencia**

---

- Proveer formación y asistencia técnica a los laboratorios de los países en desarrollo que realizan pruebas de FR-VIH en el marco de las encuestas de FR-VIH recomendadas por la OMS.
  - Elaborar módulos y materiales de formación.
  - Establecer normas técnicas para las pruebas de laboratorio dentro de la red.
  - Ayudar a la OMS a coordinar el programa de garantía de la calidad para la red.
  - Evaluar críticamente la capacidad de los laboratorios que desean ser acreditados por la OMS.
  - Participar en investigaciones para responder a las cuestiones operacionales que sean pertinentes para la implementación de la estrategia de FR-VIH de la OMS. El costo elevado de las pruebas de genotipificación, así como la logística que requiere la obtención, envío y almacenamiento de las muestras en áreas remotas supone una barrera a la ampliación de las encuestas de FR-VIH recomendadas por la OMS en muchos entornos con recursos limitados, lo que pone de relieve la necesidad de contar con pruebas menos costosas y de alto rendimiento (por ejemplo, análisis de PCR alelo-específica en tiempo real para mutaciones clave) y la validación de los protocolos de pruebas de FR-VIH utilizando gotas de fluido seco.
-

Es posible que estas tareas no estén distribuidas uniformemente entre los laboratorios mundiales especializados de FR-VIH, de tal modo que algunos laboratorios pueden ser proveedores únicos de ciertas funciones, según su disponibilidad, compromiso y conocimientos especializados. OMS: Organización Mundial de la Salud.

Además, la OMS puede apoyar solicitudes de subvenciones procedentes de laboratorios nacionales, regionales y especializados de FR-VIH relativas a la obtención de apoyo financiero de otras fuentes a fin de realizar investigaciones operacionales de importancia para la salud pública en el ámbito de la farmacorresistencia del VIH.

Uno de los objetivos de la Red de Laboratorios de la OMS/HIVResNet es apoyar la transferencia de conocimientos y competencias de los laboratorios acreditados por la OMS a los que todavía no han obtenido la acreditación. Para ello, la OMS facilita las iniciativas de colaboración entre laboratorios acreditados y no acreditados, a fin de proporcionar formación y asistencia técnica.

## **Normas para la obtención, manipulación, envío, almacenamiento y análisis de muestras**

### **Tipos de muestras para las pruebas de genotipificación de la FR-VIH**

Actualmente, el tipo de muestra obtenida más habitualmente para la genotipificación clínica de la FR-VIH es el plasma; algunos sistemas de vigilancia basados en muestras de población también utilizan plasma, mientras que otros emplean suero [10]. No obstante, para las encuestas de FR-VIH en el marco de la estrategia de la OMS, que recomienda un enfoque poblacional para las pruebas de FR-VIH más que el seguimiento individual de pacientes, se recomienda utilizar las muestras residuales obtenidas para fines diagnósticos o clínicos cuando sea posible [1].

El uso de gotas de sangre seca (GSS) ofrece ventajas en varios entornos en los que el volumen de muestras residuales es limitado, cuando no es posible separar y congelar con rapidez el plasma o suero, y mantener las muestras congeladas a temperatura uniforme resulta difícil, o cuando existen dificultades logísticas que limitan las probabilidades de enviar con éxito al laboratorio de genotipificación muestras congeladas. Otras alternativas incluyen muestras de gotas de plasma seco o gotas de suero seco. Mientras la genotipificación del VIH basada en plasma o suero descifra el perfil de FR-VIH que se encuentra en la mayoría de la población viral circulante, los resultados obtenidos a partir de muestras de sangre entera (por ejemplo, muestras de GSS) reflejan también la contribución relativa del ADN del VIH encontrado en reservorios celulares latentes [11]. En teoría, esto podría dar lugar a una incongruencia en los resultados obtenidos a partir de GSS y de plasma, si bien los últimos estudios han demostrado que las secuencias obtenidas a partir de plasma y GSS son muy comparables [12,13].

### ***Plasma***

El plasma ha sido el tipo de muestra convencional utilizado para las pruebas de FR-VIH en estudios de investigación y aplicaciones clínicas. Se utilizan tubos de plasma anticoagulado con citrato o ácido edético para recoger muestras para el recuento de linfocitos CD4 y determinación de la carga viral antes de iniciar el TARV y durante el tratamiento, por lo que se pueden utilizar fácilmente para las encuestas de FR-VIH. Los estudios realizados han indicado que el éxito de la amplificación viral utilizando plasma depende de varios factores, entre otros, la carga de ARN

viral, el tiempo transcurrido desde que se extrajo la sangre hasta que se separó el plasma, la condición del plasma después de la separación, el tiempo transcurrido entre la separación del plasma y la congelación, la temperatura de congelación de las muestras de plasma y el tiempo transcurrido antes de proceder a la extracción, amplificación y genotipificación [14–17]. Dado que los ciclos de congelación-descongelación pueden ser perjudiciales para la amplificación, el plasma congelado debería ser transportado en hielo seco y no ser descongelado antes de la genotipificación [18]. Los estudios sobre las gotas de plasma seco son más limitados, pero se puede asumir razonablemente que el fraccionamiento de la sangre en tiempo oportuno y su almacenamiento en condiciones óptimas son igual de importantes para la preparación de este tipo de muestras [19]. Solamente debería utilizarse el plasma como tipo de muestra para la genotipificación de la FR-VIH en entornos en los que este tipo de muestras puedan ser debidamente procesadas y transportadas.

### ***Suero***

El suero es el tipo de muestra preferida para las pruebas de anticuerpos contra el VIH o serovigilancia del VIH, lo que facilita relativamente organizar la obtención de muestras de suero para fines de vigilancia de la FR-VIH transmitida en entornos de diagnóstico. Los estudios han demostrado que las cargas virales en el suero son hasta 10 veces menores que en el plasma, debido probablemente al bloqueo del VIH durante la formación de coágulos [20–22] (datos sin publicar, Roche Diagnostic Systems, Inc.). Al igual que ocurre con el plasma, las ribonucleasas siguen degradando los virus del VIH hasta que el suero es congelado. Es importante respetar las recomendaciones sobre los tiempos de procesamiento para la separación y congelación de las muestras de suero [15].

### ***Gotas de fluido seco (sangre, suero o plasma)***

Aunque el plasma y el suero se consideren las muestras idóneas para fines de genotipificación, no resultan prácticas en muchos entornos con recursos limitados, debido a las limitaciones del personal e instalaciones de laboratorio, la necesidad común de realizar pruebas clínicas o diagnósticas básicas antes de alicuotar las muestras, y la falta de una cadena de frío e instalaciones que aseguren condiciones óptimas de almacenamiento y transporte.

Se ha señalado que las GSS son adecuadas para fines de serología y diagnóstico molecular del VIH [23], cuantificación del ARN viral [24] y recuento de linfocitos CD4 [25]. Más recientemente, se ha demostrado que las GSS son comparables al plasma como muestra para fines de genotipificación de la FR-VIH [12,13]. Asimismo, se ha demostrado que las gotas de suero seco también constituyen un tipo de muestra viable para la genotipificación de la FR-VIH [26]; no obstante, el requisito de que la sangre deba ser extraída mediante venopunción, así como el necesario procesamiento de laboratorio posterior pueden limitar el uso de las gotas de suero seco para fines de vigilancia en entornos con recursos limitados. En comparación con las gotas de suero seco, la sangre entera obtenida mediante punción dactilar y absorción de la sangre en papel de filtro en forma de GSS no necesitaría ninguna manipulación posterior por parte del laboratorio. El uso cada vez mayor de GSS con fines diagnósticos y clínicos en poblaciones pediátricas, y el pequeño volumen requerido (50–100 µl), también haría posible que fueran utilizadas en encuestas de FR-VIH en la población pediátrica VIH-positiva.

La obtención de muestras de sangre en papel absorbente presenta ventajas únicas para encuestas epidemiológicas y programas de detección a gran escala. Una vez que la gota de sangre se haya secado, las ribonucleasas presentes en la sangre que degradan el ARN del VIH se inactivan, lo que permite al virus mantenerse estable durante períodos prolongados. Dado que no es necesario proceder a la congelación de las muestras para almacenarlas a corto plazo, las muestras de GSS se pueden transportar con más facilidad en países con recursos limitados, que pueden carecer de los medios o infraestructuras necesarias para mantener las muestras congeladas durante su transporte. Las GSS se utilizan de forma generalizada en muchos entornos con recursos limitados como tipo de muestra para la serovigilancia del VIH, lo que permite integrar fácilmente las pruebas de FR-VIH en los programas de vigilancia del VIH existentes. Asimismo, se pueden preparar GSS a partir de la sangre anticoagulada extraída para fines de recuento de linfocitos CD4 u otras pruebas clínicas de rutina, por lo que podrían constituir un tipo de muestra adecuada para las encuestas de seguimiento de la FR-VIH. Además, el papel absorbente especialmente formulado para la toma de sangre es poco costoso y está disponible comercialmente.

### **Procesamiento de las muestras**

El establecimiento de normas para la obtención, manipulación, envío y almacenamiento de muestras para pruebas de FR-VIH es una etapa fundamental a fin de producir resultados de laboratorio exactos. La red de laboratorios facilita documentos con directrices que permiten normalizar todos los componentes de las pruebas de laboratorio de FR-VIH, entre otras, relativas a la obtención, manipulación, envío y almacenamiento de las muestras (Cuadro 2). Es importante seguir estas recomendaciones para asegurar la integridad de las muestras y la calidad de los datos de secuencias. Por ello, los países deben incorporarlas en su estrategia nacional relativa a las pruebas de FR-VIH para apoyar las encuestas de FR-VIH.

### **Garantía de la calidad**

La garantía de la calidad es un elemento primordial de las encuestas de FR-VIH. Aunque muchos laboratorios en países con ingresos bajos y medianos tienen experiencia en la genotipificación, la ausencia de metodologías normalizadas para las diferentes regiones incide de forma negativa en la fiabilidad y comparabilidad de los datos. Para garantizar la obtención de resultados coherentes en laboratorios de pruebas de FR-VIH geográficamente muy dispersos se utilizan diversos métodos, entre otros, la aplicación de criterios estándar de acreditación, difusión de documentos de orientación, capacitación, uso de pruebas validadas y participación en programas externos de pruebas de competencia para genotipificación de la FR-VIH.

La finalidad de los programas de garantía de la calidad es asegurar que todos los laboratorios de la red apliquen las mismas normas, independientemente de la categoría a la que pertenezcan como miembro de la red, permitiendo de ese modo mejorar constantemente la eficacia de la red.

Para ser acreditado, un laboratorio debe superar con éxito las pruebas de competencia de la OMS.

El programa de pruebas de competencia de la OMS se elabora teniendo en cuenta los siguientes aspectos: las muestras utilizadas para las pruebas de competencia deben proceder de muestras



clínicas diluidas o propagación en cultivo celular; las pruebas de competencia deben contener muestras con varios codones mutantes en las regiones de la transcriptasa inversa y la proteasa, así como codones naturales; las pruebas de competencia deben incluir un mínimo de cinco muestras diferentes; en las pruebas deben estar representados varios subtipos del VIH-1 (por lo menos un subtipo B, un subtipo C y por lo menos un subtipo no B/no C); las muestras deben tener una carga viral mínima de 5.000 copias/ml; las muestras empleadas en las pruebas de competencia deben ser compatibles con todas las pruebas comerciales (todas las muestras de las pruebas deben ser validadas utilizando todos los kits comerciales antes de su distribución); y las pruebas de competencia pueden incluir muestras que contengan una mezcla igual de dos variantes de virus definidas.

Las pruebas se distribuyen como mínimo una vez al año bajo la dirección de la OMS. Los resultados de los laboratorios individuales se puntuarán comparando la secuencia de cada laboratorio con la secuencia consenso derivada de todos los laboratorios participantes (laboratorios nacionales, regionales y especializados de farmacorresistencia). A fin de obtener una secuencia consenso válida, por lo menos 10 laboratorios deberán realizar cada una de las pruebas. Para preparar la secuencia consenso, primeramente se alinean las secuencias presentadas por todos los laboratorios participantes en el programa. En cada posición del alineamiento, se incluye en la secuencia consenso el nucleótido, o mezcla de nucleótidos, observado en >80% de las secuencias presentadas. Para superar las pruebas de competencia, la concordancia de los codones asociados a la resistencia (para mutaciones mayores y menores) en las regiones de la transcriptasa inversa y la proteasa, así como la concordancia general de la secuencia de nucleótidos debe ser  $\mu$ 99%.

Es primordial que los laboratorios de la red mantengan contacto regular entre sí a fin de revisar los progresos realizados, elaborar estrategias para la realización de pruebas, examinar nuevas metodologías y, en general, mejorar la eficacia de la red. La participación anual en las pruebas de competencia reconocidas por la OMS/HIVResNet es obligatoria para todos los laboratorios nacionales, regionales y especializados que han obtenido la acreditación. Además, todos los laboratorios candidatos que desean ser acreditados por la OMS deben participar en los programas de pruebas de competencia de farmacorresistencia de la OMS. Por el momento, el National Institutes of Health, en nombre de la OMS, ha aceptado elaborar un conjunto de pruebas de competencia basado en las especificaciones de la OMS y distribuirlo a los laboratorios de las distintas regiones del mundo que desean obtener la acreditación de la OMS. En el futuro, esta función podría ser asumida por uno de los laboratorios especializados. En enero de 2008, se habían enviado las pruebas de competencia a 33 laboratorios que habían solicitado la acreditación de la OMS. Hasta la fecha, Quality Control for Molecular Diagnostics (Glasgow, Reino Unido), ha realizado el análisis de las pruebas de competencia y proporcionado resultados a la OMS.

### **Acreditación por la OMS de laboratorios de FR-VIH**

El objetivo principal del proceso de acreditación es asegurar que todos los laboratorios logren el mismo nivel de rendimiento. Solamente los laboratorios de genotipificación acreditados por la OMS obtienen el estatus de miembros plenos de la Red de Laboratorios de la HIVResNet. El proceso de acreditación ofrece a los laboratorios una oportunidad de aprendizaje, además de

constituir un mecanismo para identificar las necesidades en materia de recursos y capacitación, y permitir evaluar el progreso de los laboratorios. El proceso de acreditación se divide en tres etapas, a saber, solicitud, visita de evaluación y acreditación, y prevé la realización de revisiones anuales del rendimiento. La acreditación de los laboratorios para la realización de pruebas de genotipificación de la FR-VIH a partir de muestras de plasma o GSS se obtiene por separado.

---

**Cuadro 2.** Recomendaciones clave de la OMS/HIVResNet sobre el almacenamiento y transporte de muestras

---

**Procesamiento de plasma o suero para fines de encuestas de FR-VIH**

- Las muestras de sangre entera deben mantenerse a temperatura ambiente (15–30°C) desde el momento de su obtención hasta la centrifugación y separación. Las muestras recogidas para pruebas de FR-VIH deben ser fraccionadas y el suero/plasma debe ser refrigerado de preferencia en un plazo de 24–48 h. (y en ningún caso transcurridas más de 72 h.). Las alícuotas deben ser congeladas dentro de las 96 h. siguientes a la recogida de la muestra.
- En los casos en los que las pruebas de FR-VIH se realicen a partir de muestras obtenidas para fines de determinación de la carga viral del VIH, la sangre debe ser fraccionada y congelada en un plazo máximo de 24–48 h. desde el momento de su extracción.
- Se debe obtener por lo menos 1 ml (500 µl es el volumen mínimo exigido para extracción) de plasma o suero y almacenarlo a [-20°C.
- Debe evitarse las congelaciones y descongelaciones múltiples.
- Las muestras congeladas siempre deben ser transportadas en hielo seco.
- Los envíos deben prepararse en condiciones consideradas adecuadas para materiales infecciosos.
- Los tubos deben ser etiquetados utilizando marcadores de tinta indeleble y etiquetas resistentes a la congelación.

**Almacenamiento\* y envío de GSS para encuestas de FR-VIH**

Almacenamiento de corta duración (<30 días) de GSS en el centro de recolección.

- Asegúrese que las GSS están completamente secas antes de embalarlas.
- Para evitar la contaminación, manipule el papel de filtro por los bordes.
- Coloque de forma individual las GSS secas en una bolsa de plástico impermeable al gas sellada con cierre hermético que contenga 1–2 pastillas secantes (para eliminar la humedad residual) y tarjetas que indiquen la humedad.
- Almacene las GSS a temperatura ambiente (15–30°C) durante un período máximo de 2 semanas, evitando su exposición directa a la luz.
- Los materiales de ácidos nucleicos de las GSS son sumamente sensibles a la degradación en presencia de humedad. Compruebe a diario la tarjeta indicadora de humedad y cambie las pastillas secantes si el color indicador cambia de azul a rosa.
- Transporte las GSS a temperatura ambiente desde el centro de recolección hasta el laboratorio de procesamiento que realizará las pruebas de genotipificación lo antes posible (de preferencia en un plazo de 7 a 14 días).
- En entornos en los que no sea posible, transporte las GSS a temperatura ambiente a un laboratorio con un suministro eléctrico constante y almacénelas a [-20°C en un congelador en que se haya evaluado la humedad y se haya confirmado su idoneidad para el almacenamiento a largo plazo de las GSS.

Almacenamiento de larga duración (>30 días) de GSS en el laboratorio central.

- El almacenamiento de larga duración de las GSS debería realizarse en un establecimiento central. Las GSS deben almacenarse, con secante, a [-20°C en las bolsas originales herméticamente cerradas que no se hayan abierto.

**Envío de GSS**

- Las GSS deben ser enviadas como material no infeccioso.
- A fin de preparar las GSS para ser transportadas, cambie los secantes antes de su transporte si las bolsas han permanecido en el centro durante más de 7 días antes de su transporte, incluso si el indicador sigue siendo de color azul.
- Las GSS que han sido almacenadas a temperatura ambiente deben ser enviadas a temperatura ambiente.
- Las GSS que han sido congeladas deben ser transportadas en hielo seco y es necesario dejar que se equilibren completamente a temperatura ambiente durante un mínimo de 30 minutos antes de abrir la bolsa. Una vez equilibradas, se debe abrir la bolsa exterior y sustituir el secante con secante nuevo. Debe colocar las GSS equilibradas en un sobre y enviarlas a temperatura ambiente.

**Amplificación y secuenciación**

- Los laboratorios que realizan pruebas de genotipificación deben establecer un alto nivel de normalización, adoptando, entre otros, un control de la calidad de la capacitación del personal y el uso de procedimientos normalizados de trabajo revisados externamente por expertos.
- Para los laboratorios que están iniciando la genotipificación del plasma y suero, se prefiere el uso de kits de pruebas más que la utilización de pruebas "caseras" o de fabricación interna.
- Las pruebas de fabricación interna sólo deberían utilizarse después de ser debidamente validadas, lo que incluye una evaluación del rendimiento de la prueba con distintos subtipos del VIH-1.
- Las pruebas de FR-VIH que utilizan GSS debería realizarse únicamente en un laboratorio con la debida experiencia.
- Es fundamental secuenciar las dos cadenas de ADN.
- Las regiones mínimas para las que se debe reunir información de secuencia son los codones 10–99 de la proteasa y los codones 41–220 de la transcriptasa inversa.

---

\*Es necesario realizar estudios más sistemáticos para comprender mejor la estabilidad del material genético en las GSS (gotas de sangre seca) almacenadas a diferentes temperaturas y durante distintos períodos de tiempo. La OMS (Organización Mundial de la Salud) actualizará regularmente sus recomendaciones para reflejar los nuevos datos disponibles. FR-VIH: farmacorresistencia del VIH.

---

**Cuadro 3. Criterios evaluados para los laboratorios candidatos que desean obtener la acreditación de la OMS**


---

**Criterios obligatorios**

## Laboratorios nacionales de FR-VIH

- El laboratorio debe haber sido designado por el Ministerio de Salud como laboratorio candidato para realizar pruebas de FR-VIH en el marco de la estrategia nacional.
- Existencia de una estrategia nacional para la vigilancia y/o seguimiento de la FR-VIH de la OMS elaborada por el Ministerio de Salud.
- Existencia de una infraestructura mínima para la genotipificación de la FR-VIH.
- Más de 1 año de experiencia en la genotipificación de los virus del VIH o ARN y >100 muestras analizadas.
- Participación exitosa en el programa de pruebas de competencia de la OMS.

## Laboratorios regionales de FR-VIH

- Carta de acuerdo del Ministerio de Salud.
- Más de 1 año de experiencia en genotipificación de la FR-VIH.
- Existencia de infraestructura mínima para la genotipificación de la FR-VIH.
- Participación exitosa en el programa de pruebas de competencia de la OMS.

## Laboratorios especializados de FR-VIH

- Superación de las pruebas de competencia de la OMS.
- Experiencia y liderazgo reconocidos a escala internacional en el ámbito de la genotipificación de la FR-VIH.

**Criterios de acreditación**

## Laboratorios nacionales de FR-VIH

- Infraestructura y equipamiento de laboratorio completos para la genotipificación de la FR-VIH.
- Conocimientos especializados adecuados por parte del personal de laboratorio, con un mínimo de un profesional de laboratorio dedicado exclusivamente a la genotipificación de la FR-VIH.
- Experiencia del laboratorio en genotipificación:
  - Número de años de experiencia en genotipificación del VIH o en genotipificación, basada en análisis secuencial, de otros virus ARN distintos del VIH.
  - Número de muestras de VIH secuenciadas.
- Estructura de gestión del laboratorio y sostenibilidad financiera.
- Procedimientos normalizados de trabajo documentados y debidamente implementados.
- Participación exitosa en un programa de garantía de la calidad distinto al de la OMS durante el último año.

## Laboratorios regionales de FR-VIH

- Experiencia y liderazgo reconocidos a escala regional en ciencias de laboratorio en el ámbito del VIH.
- Infraestructura y equipamiento de laboratorio completos para la genotipificación de la FR-VIH.
- Experiencia del laboratorio en genotipificación de la FR-VIH:
  - Número de años de experiencia en genotipificación de la FR-VIH.
  - Número de muestras de VIH genotipificadas.
  - Conocimientos especializados por parte del personal en genotipificación, incluidas otras técnicas diferentes a las de los kits comerciales.
- Experiencia en la impartición de formación y establecimiento de iniciativas de colaboración en ciencias de laboratorio en los últimos 3 años.

- Sostenibilidad administrativa y financiera del laboratorio; voluntad de solicitar fondos para llevar a cabo actividades regionales de servicios de referencia en FR-VIH.
  - Conocimientos especializados por parte del personal del laboratorio, con un mínimo de dos auxiliares de laboratorio capacitados en genotipificación de la FR-VIH.
  - Todos los procedimientos normalizados de trabajo documentados y debidamente implementados.
  - Capacidad de prestar servicios de virología de referencia a otros laboratorios.
  - Participación exitosa en programas de garantía de la calidad distintos al de la OMS durante los 2 últimos años.
- Laboratorios especializados de FR-VIH
- Laboratorio preparado para la genotipificación de la FR-VIH.
  - El laboratorio realiza investigaciones originales en FR-VIH.
  - Experiencia del laboratorio en genotipificación del VIH:
    - Número de años de experiencia en genotipificación de la FR-VIH.
    - Número de muestras de VIH genotipificadas.
    - Número de años de experiencia realizando pruebas no comerciales de FR-VIH.
  - Experiencia en la impartición de formación y establecimiento de iniciativas de colaboración en el ámbito de la FR-VIH en los últimos 3 años.
  - Sostenibilidad administrativa y financiera del laboratorio, y capacidad de apoyar las actividades de la HIVResNet de la OMS a través del presupuesto central del laboratorio y/u obteniendo financiamiento de fuentes externas en caso necesario.
  - Conocimientos especializados por parte del personal del laboratorio, con un mínimo de dos auxiliares de laboratorio capacitados en genotipificación de la FR-VIH.
  - Procedimientos normalizados de trabajo claramente documentados y debidamente implementados.
  - Capacidad de prestar servicios de virología de referencia a otros laboratorios.
  - Participación exitosa en programas de garantía de la calidad distintos al programa de la OMS durante los 2 últimos años.
  - Voluntad de intercambiar información y trabajar en cooperación con la OMS y otros laboratorios de la Red de FR-VIH.

FR-VIH: farmacorresistencia del VIH; OMS: Organización Mundial de la Salud.

Para obtener la acreditación, los laboratorios candidatos nacionales, regionales o especializados de farmacorresistencia deben cumplir una serie de criterios obligatorios y obtener la puntuación requerida en los criterios de acreditación adicionales (Cuadro 3). Antes de que un laboratorio candidato reciba una visita de evaluación, debe completar una solicitud que incluye una lista de control y un cuestionario de evaluación. El laboratorio debe remitir la solicitud a la OMS, junto con los documentos adicionales solicitados. La lista de control permite determinar si el laboratorio cumple con los requisitos mínimos para que se considere su evaluación. Durante el proceso de evaluación se examinarán todos los aspectos significativos de la lista de control, que tiene también por finalidad orientar a los laboratorios en sus preparativos para la etapa de evaluación. Si la solicitud es aprobada, se realizará una visita de evaluación in situ del laboratorio para verificar sus competencias y capacidades. La visita de evaluación para fines de acreditación incluye una evaluación de la experiencia y capacidad del laboratorio en secuenciación del VIH, así como de una serie de indicadores de rendimiento tales como las competencias del personal, las instalaciones, el equipamiento, las prácticas de gestión, la seguridad y la sostenibilidad financiera. A los laboratorios que no cumplen con los criterios se les instará a aplicar las recomendaciones formuladas a fin de satisfacer las normas de acreditación.

Si en la visita de evaluación el laboratorio obtiene resultados positivos, éste deberá pasar y superar las próximas pruebas de competencia reconocidas por la OMS disponibles. La secuenciación exitosa de muestras proporcionadas en el marco del programa mundial de pruebas de competencia en genotipificación es un elemento clave para recibir y mantener la acreditación.

La Red de Laboratorios de FR-VIH de la OMS/HIVResNet todavía se encuentra en su fase de ampliación, y se va estableciendo a medida que los países centran sus actividades y recursos en la ampliación acelerada del acceso a tratamiento antirretroviral y en planes nacionales para el control de la FR-VIH. El proceso de acreditación empezó en noviembre de 2005 con el objetivo de lograr una cobertura mundial para 2008–2009. En agosto de 2007, se habían realizado visitas de evaluación para fines de acreditación a 30 laboratorios, pertenecientes a las regiones de la OMS de África, Asia Sudoriental, Pacífico Occidental y el Caribe. Los resultados de las visitas de evaluación y de las pruebas de competencia fueron presentados bajo anonimato a un comité independiente de expertos internacionales en el campo de la FR-VIH y ciencias de laboratorio en el área del VIH.

Hasta ahora, en 2007 se ha otorgado la acreditación a cuatro laboratorios especializados, dos laboratorios regionales y un laboratorio nacional (Cuadro 4). Aunque varios laboratorios candidatos demostraron aplicar buenas normas, se les animó a implementar una serie de recomendaciones a fin de obtener la acreditación.

## Conclusión

La necesidad de contar con una metodología estándar para las encuestas de FR-VIH exige adoptar un enfoque colectivo normalizado para las pruebas de laboratorio de la FR-VIH en todo el mundo, incluidos los entornos con recursos limitados. El establecimiento por la OMS de la Red Mundial de Laboratorios de la OMS/HIVResNet está avanzando con rapidez. Su creación se ha inspirado en el ejemplo exitoso de otras redes coordinadas por la OMS, por ejemplo, en el ámbito de la poliomielitis, el sarampión, la gripe y la tuberculosis. El proceso de acreditación de los laboratorios de FR-VIH de la OMS empezó en noviembre de 2005, fijándose como meta lograr la cobertura mundial para 2008–2009. Para julio de 2007, con un apoyo internacional adecuado, esta red podrá ofrecer datos fiables para las actividades de control de la FR-VIH a escala nacional, regional y mundial.

---

**Cuadro 4.** Laboratorios acreditados por la Organización Mundial de la Salud a fecha de 2007

---

### Laboratorios especializados

- University Medical Center Utrecht, Department of Virology, Utrecht, Países Bajos
- UMR145, AIDS and Associated Diseases, IRD and UM1, Montpellier, Francia
- Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital Carlos III, Madrid, España
- National Laboratory for HIV Genetics, Public Health Agency of Canada, Ottawa, Canadá

### Laboratorios regionales

- Service de Virologie Immunologie, Centre Hospitalier Universitaire de Fort de France, Martinica
- Clinical Research Laboratory, Burnet Institute, Melbourne, Australia

### Laboratorios nacionales

- National AIDS Research Institute, Pune, India
-

## Agradecimientos

Agradecemos el apoyo prestado por International Medical Press para la publicación de este artículo. Algunos de los autores son miembros del personal de la Organización Mundial de la Salud. Las opiniones expresadas en este documento son responsabilidad exclusiva de los autores y no representan necesariamente las decisiones o política declarada de la OMS.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no tienen intereses en conflicto.

## Bibliografía

1. Gilks CF, Crowley S, Ekpini R *et al.* The WHO publichealth approach to antiretroviral treatment against HIV in resource-limited settings. *Lancet* 2006; 368:505–510.
2. Bennett DE, Bertagnolio S, Sutherland D, Gilks CF. The World Health Organization's global strategy for prevention and assessment of HIV drug resistance. *Antivir Ther* 2008; 13 Suppl 2:1–13.
3. Hull BP, Dowdle WR. Poliovirus surveillance: building the global polio laboratory network. *J Infect Dis* 1997; 175:S113–S116
4. World Health Organization. Polio laboratory network (accessed: 10 March 2008). Available from [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/laboratory\\_polio/en/index.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/laboratory_polio/en/index.html)
5. Featherstone D, Brown D, Sanders R. Development of the Global Measles Laboratory Network. *J Infect Dis* 2003; 187 Suppl 1:S264–S269.
6. World Health Organization. Measles and rubella laboratory network (accessed: 10 March 2008). Available from [http://www.who.int/immunization\\_monitoring/laboratory\\_measles/en/index.html](http://www.who.int/immunization_monitoring/laboratory_measles/en/index.html)
7. World Health Organization. Development of a global human papillomavirus (HPV) laboratory network: call for applications (last accessed 10 March 2008). Available from [http://www.who.int/biologicals/areas/human\\_papillomavirus/WHO\\_HPVLabNet/en/index.html](http://www.who.int/biologicals/areas/human_papillomavirus/WHO_HPVLabNet/en/index.html)
8. World Health Organization. Global influenza surveillance (accessed 10 March 2008). Available from <http://www.who.int/csr/disease/influenza/influenzanelwork/en/index.html>.
9. Aziz MA, Wright A, Laszlo A, *et al.* Epidemiology of antituberculosis drug resistance (the Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance): an updated analysis. *Lancet* 2006; 368:2142–2154.
10. Jayaraman GC, Archibald CP, Kim J, *et al.* A populationbased approach to determine the prevalence of transmitted drug-resistant HIV among recent versus established HIV infections: results from the Canadian HIV strain and drug resistance surveillance program. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2006; 42:86–90.
11. McNulty A, Jennings C, Bennett D. Evaluation of dried blood spots for human immunodeficiency virus type 1 drug resistance testing. *J Clin Microbiol* 2007; 45:517–521.
12. Bertagnolio S, Soto-Ramirez S, Pilon R, *et al.* HIV-1 drug resistance surveillance using dried whole blood spots. *Antivir Ther* 2007; 12:107–113.
13. Masciotra S, Garrido C, Youngpairoj AS, *et al.* High concordance between HIV-1 drug resistance genotypes generated from plasma and dried blood spots in antiretroviral-experienced patients. *AIDS* 2007; 21:2503–2511.
14. Holguin A, Williams L, Castilla J, Soriano V. Influence of time and storage conditions on plasma HIV viral load measurements. *Antivir Ther* 1997; 2:265–268.
15. Sebire K, McGavin K, Land S *et al.* Stability of human immunodeficiency virus RNA in blood specimens as measured by a commercial PCR-based assay. *J Clin Microbiol* 1998; 36:493–498.
16. Ginocchio CC, Wang XP, Kaplan MH, *et al.* Effects of specimen collection, processing, and storage conditions on stability of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma. *J Clin Microbiol* 1997; 35:2886–2893.
17. Bruisten SM, Oudshoorn P, van Swieten P. Stability of HIV-1 RNA in blood during specimen handling and storage prior to amplification by NASBA-QT. *J Virol Methods* 1997; 67:199–207.

18. Gessoni G, Barin P, Valverde S, *et al.* Biological qualification of blood units: considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. *Transfus Apher Sci* 2004; 30:197–203.
19. Brambilla D, Jennings C, Aldrovandi G, *et al.* Multicenter evaluation of use of dried blood and plasma spot specimens in quantitative assays for human immunodeficiency virus RNA: measurement, precision, and RNA stability. *J Clin Microbiol* 2003; 41:1888–1893.
20. Griffith BP, Rigsby MO, Garner RB *et al.* Comparison of the Amplicor HIV-1 monitor test and the nucleic acid sequence-based amplification assay for quantitation of human immunodeficiency virus RNA in plasma, serum, and plasma subjected to freeze–thaw cycles. *J Clin Microbiol* 1997; 35:3288–3291.
21. Holodniy M, Mole L, Yen-Lieberman B, *et al.* Comparative stabilities of quantitative human immunodeficiency virus RNA in plasma from samples collected in VACUTAINER CPT, VACUTAINER PPT, and standard VACUTAINER tubes. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1562–1566.
22. Coombs RW, Henrard DR, Mehaffey WF, *et al.* Cell-free plasma human immunodeficiency virus type 1 titer assessed by culture and immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1980–1986
23. Cassol S, Weniger BG, Babu PG, *et al.* Detection of HIVtype env subtype A, B, C and E in Asia using dried blood spots: a new surveillance tool for molecular epidemiology. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:1435–1441.
24. Mwaba P, Cassol S, Nunn A, *et al.* Whole blood versus plasma spots for measurement of HIV-1 viral load in HIV-infected African patients. *Lancet* 2003; 362:2067–2068.
25. Mwaba P, Cassol S, Pilon R, *et al.* Use of whole dried whole blood to measure CD4+ lymphocyte count in HIV-1 infected patients. *Lancet* 2003; 362:1459–1460.
26. Plantier JC, Dachraoui R, Lemee V, *et al.* HIV-1 resistance genotyping on dried serum spots. *AIDS* 2005; 19:391–397.

-----Aceptado para publicación el 27 de julio de 2007-----