

Revista Mexicana de Patología Clínica

Volumen 46
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 1999
July-September

Artículo:

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo I. Interpretación de la prueba de «carga viral»

Derechos reservados, Copyright © 1999:
Federación Mexicana de Patología Clínica, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)



Medigraphic.com

Virus de la inmunodeficiencia humana tipo I. Interpretación de la prueba de «carga viral»

Palabras clave: Carga viral, ARN-VIH-I, SIDA, ARN-VIH-I plasmático.

Key words: Viral load HIV-I-RNA, AIDS, plasmatic HIV-I-RNA.

Recibido:05/07/99
Aceptado:29/07/99

Gustavo Barriga Angulo,* Nohemí Patricia Castillo Torres*

* Hospital de Infectología, Centro Médico «La Raza». IMSS.

Correspondencia:

Dr. Gustavo Barriga Angulo

Hospital de Infectología, Centro Médico «La Raza» IMSS

Seris y Zaachila s/n

Col. La Raza. 02990, México DF

Resumen

México ocupa el 13° lugar en número de casos de SIDA a nivel mundial y el 3° en el Continente Americano, con un número estimado de 80,000. La disponibilidad tanto de medicamentos antirretrovirales efectivos en su tratamiento como de pruebas sensibles y específicas para medir la carga viral al HIV-I ha modificado favorablemente el panorama de este padecimiento. Sin embargo, la correcta interpretación de los resultados de estas pruebas es fundamental para su adecuada utilización.

En la interpretación de estas pruebas es importante considerar las numerosas variables preanalíticas, analíticas y posanalíticas que pueden afectarlas y considerar la manera más adecuada de tomar y conservar las muestras para estudio, el efecto de variaciones y numerosas patologías sobre sus valores, así como la elección de la prueba más adecuada en términos de precisión, reproducibilidad, sensibilidad, especificidad, costo, facilidad de realización y su interpretación en términos logarítmicos y no aritméticos.

Introducción

A partir de 1985, cuando se dispuso por primera vez de pruebas de laboratorio para el diagnóstico de la infección con los virus de la

Summary

The number of cases of AIDS in Mexico has been estimated around 80,00 in America we have the third place, and worldwide the 13th.

The development of sensitive and precise nucleid acid amplification assays the measurement of HIV-I «viral load» infected patients and powerful new antiretroviral drugs have been essential elements in a favourable change in the monitoring and adjustment of an effective therapy.

Viral load assays can be affected by numerous variables of interest and concern to the clinicians treating HIV-I infected patients, the sources of these variables can be categorized as preanalytical, analytical and post-analytical, like sample collection, processing and storage; the effect of vaccinations and concurrent microbial infections, biological variations; the interpretation of his results; and the election of the most adequate viral load assay in terms of precisions specificity, reproducibility, linearity and cost.

inmunodeficiencia humana, ha sido notable el avance en su desarrollo y aplicación clínica y epidemiológica, lo que ha permitido la detección oportuna de la infección y elevado la calidad de vida de las personas infectadas; esto ha sido posible gracias a la disponi-

bilidad de medicamentos antirretrovirales efectivos y de pruebas de cuantificación de ácidos nucleicos precisas y sensibles; sin embargo, su desarrollo ha sido tan rápido que en ocasiones resulta difícil para el clínico su interpretación adecuada, motivo por el cual se señalarán los aspectos más trascendentes sobre este tema.

El síndrome de inmunodeficiencia humana en México, igual que en el resto de países del mundo, se ha convertido en un problema complejo de salud pública, con múltiples repercusiones psicológicas, sociales, éticas, económicas y políticas que rebasan el ámbito de la salud.

Según estimaciones del programa de la Organización de las Naciones Unidas para la prevención del SIDA a mediados de 1999 había 40,000,000 de personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana en todo el mundo; además 14,000,000 ya han fallecido, y en promedio 16,000 personas por día son infectadas.

México ocupa el 13° lugar mundial en cuanto al número total de casos notificados y el 3° en el Continente Americano. Desde el inicio de la epidemia y hasta fines de julio de 1999 se han registrado de manera acumulada 44,387 casos en nuestro país. Sin embargo, esta cifra constituye sólo una aproximación a la magnitud real de la epidemia debido al retraso en la notificación y al subdiagnóstico, calculándose que el número real de casos acumulados es de 80,000 y el número de infectados oscila entre 174,000 y 200,000.¹

Dos grandes avances en los últimos cinco años han venido a modificar favorablemente el panorama de las personas infectadas con los virus de la inmunodeficiencia humana: en primer lugar el poder disponer de medicamentos antirretrovirales efectivos y que combinados sinergizan su actividad; en segundo lugar la disponibilidad en el laboratorio clínico de pruebas de cuantificación de ácidos nucleicos del HIV-1, precisas y sensibles, habitualmente la cuantificación del ARN del HIV-1 en plasma. Hasta antes de 1987 el término «carga viral» no existía; fue el Dr. Jonas Salk el primero en utilizarlo en un artículo, proponiendo

que ésta podría ser reducida estimulando la respuesta inmune al HIV-1.² Los métodos cuantitativos de laboratorio que miden la carga viral pueden describirse como las pruebas que evalúan el nivel de toda actividad de replicación viral y son un reflejo de la infección subyacente.

La utilidad de la determinación de la *carga viral* ha sido demostrada ampliamente en numerosos estudios a partir de los trabajos pioneros de Mellors, Ho,³⁻⁴ etcétera. Se le considera ahora como el más importante predictor de progresión de la enfermedad y en la evaluación de la efectividad de la terapia antirretroviral; su utilidad pronóstica ha sido demostrada en estudios prospectivos asociando los niveles del virus en sangre periférica y el desarrollo subsecuente de SIDA o muerte. Esta asociación se ha demostrado tanto en personas recientemente infectadas asintomáticas, como en sujetos en diferentes niveles de tratamiento.⁵⁻⁷

El tratamiento antiviral efectivo modifica la carga viral disminuyéndola a niveles no detectables en personas que reciben terapias combinadas; en niños el nivel máximo de carga viral se encuentra entre el primero y el segundo mes de vida, declinando progresivamente hasta los dos años de edad, progresando a SIDA los que aún muestran niveles elevados a los 12 meses de vida.

El periodo de latencia clínica no es un periodo de *latencia inmunológica o virológica*, ya que la producción de partículas virales se estima en 10.3×10^9 viriones por día, con una posible mutación cada $10^4 - 10^5$ veces por día, resultando en la presencia de mutaciones aún antes de iniciar la terapia; estas variantes se liberan rápidamente dominando a la población viral replicante, llevando a un rebote viral y a una falla terapéutica.⁸

Cuando nos referimos a pruebas de *carga viral* es importante tener en mente sus tres diferentes componentes:

- a) *El analito* o blanco de la prueba que puede ser la región a amplificar del ARN viral ya sea la fracción POL o GAG.

b) *El compartimento* o sea el tejido a estudiar: plasma, tejido linfoide, líquido seminal, líquido cefalorraquídeo, etc.

c) *La tecnología utilizada*; las pruebas comerciales disponibles para determinar el HIV-1 ARN viral en nuestro país son: *Quantiplex HIV-1 RNA 3.0 Assay* (b DNA) Chiron Diagnostics; *Amplicor HIV-1 Monitor Assay*, Roche Diagnostic Systems; *Nucleic Acid Sequence Based Amplification NASBA*: HIV-1 RNA quantitative assay Organon Teknika y *Digene Hybrid HIV-1 ARN Digene Co.*⁹ Dos de ellas: Amplicor y NASBA muestran las mayores ventajas técnicas sobre las demás en términos de sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y automatización; sin embargo, la de NASBA supera a todas las demás ya que puede utilizar cualquier tipo de muestra biológica (líquido cefalorraquídeo, semen, exudado cervicovaginal, plasma, etc.) lo que la hace ideal por ejemplo para patología neurológica, o con fines epidemiológicos; el volumen de muestra a emplear es muy flexible: 0.01 a 2 mL, lo que facilita su empleo en pacientes pediátricos o con venas difíciles; no existe pérdida de reactivos por controles, y su rango de tolerancia es muy

amplio, 50 a 10,000,000 de partículas virales por mL (*cuadro I*).¹⁰⁻¹³

Cada uno de estos componentes como se verá más adelante puede afectar e influir en el resultado del estudio y su interpretación.

Las pruebas de *carga viral*, como todas las pruebas del laboratorio clínico, pueden verse afectadas por numerosas variables que pueden categorizarse en tres grupos principales:

- 1) Preanalíticas
- 2) Analíticas
- 3) Posanalíticas

Preanalíticas

Las variables *preanalíticas*, o sea las que suceden antes de probar la muestra, son los eventos que pueden llevar a la activación del sistema inmune tales como vacunaciones, infecciones microbianas concurrentes, y pruebas intradérmicas, que pueden ocasionar aumentos transitorios en los niveles del ARN plasmático del HIV-1, como resultado de un incremento en el número de células blanco susceptibles a la infección con el HIV-1. Se han repor-

Cuadro I. Técnicas de amplificación del ARN HIV-1 - características.

Característica	Pruebas comerciales disponibles			
	b DNA	Hybrid	Amplicor	NASBA
Volumen de muestra	2 mL	1.5 mL	0.5 mL	.01 - 2 mL
Tipo de muestra	Plasma	Plasma	Plasma	Cualquiera
Anticoagulante	EDTA	EDTA	EDTA	Cualquiera
Equipo especial	Centrífuga Refrigerada	Centrífuga Refrigerada	Centrífuga Refrigerada Monitor	Extractor
Automatización	No	No	Sí	Sí
Tipo de prueba	Amplificación Señal	Amplificación Señal	Amplificación Blanco	Amplificación Blanco
contaminación	Baja	Baja	Alta	Baja
Sensibilidad	Media	Media	Alta	Alta
Reproducibilidad	Media	Media	Alta	Alta
Merma por controles	Sí	Sí	Sí	No
Controles internos	No	No	no	3 por prueba
Límite de detección	50 cp mL	500 cp mL	50 cp mL	50 cp mL

tado aumentos transitorios de la carga viral después de transfusiones, cuadros agudos de influenza, neumonía por neumococo, por *Pneumocystis carinii*, tuberculosis, enteritis por citomegalovirus, herpes simple, candidosis, así como vacunaciones contra *Haemophilus influenzae*, neumococo, toxoide tetánico, etc; la magnitud del incremento en la carga viral es proporcional al grado de activación inmune asociado; en la mayoría de los casos los niveles son dos a tres veces mayores que el basal en la fase aguda, retornando a su nivel original uno a dos meses después del evento.¹⁴⁻²⁰

A diferencia de lo observado con los niveles de linfocitos CD4+, los de *carga viral* son muy estables en términos de variación diurna, diaria, semanal o mensual.^{21,22}

El tiempo de procesamiento, el tipo de anticoagulante y las condiciones de almacenamiento tienen un efecto significativo en la determinación de carga viral; los anticoagulantes como la heparina pueden afectar la recuperación y la estabilidad del ácido nucleico viral; el citrato de sodio es aceptable y el EDTA es el óptimo para todas las pruebas. El plasma debe de ser separado de las células dentro de las primeras cuatro horas después de tomarse y congelarse a -70 °C.²³⁻²⁵

Variables analíticas

Hay siete características que pueden tener un importante efecto en los resultados de esta prueba:

- 1) Técnica utilizada
- 2) Linearidad
- 3) Exactitud
- 4) Reproducibilidad
- 5) Precisión y tolerancia
- 6) Sensibilidad
- 7) Especificidad

Técnica utilizada

En nuestro medio disponemos comercialmente de cuatro diferentes pruebas (*cuadro I*) que en general

pueden dividirse en dos tipos basándose en el paso en que tiene lugar la amplificación, ya sea de la señal o del blanco; en el primer tipo se obtiene una medición directa del nivel original del analito a través de una prueba de hibridización secuencial; en el segundo, el ácido nucleico es amplificado enzimáticamente. Las diferentes pruebas muestran grandes variaciones en su sensibilidad, reproducibilidad, límite de detección, volumen y tipo de muestra necesaria como se muestra en el *cuadro I*.

Linearidad

Es la medida en que los resultados de las pruebas (copias de ARN por mililitro) son proporcionales a la concentración del analito en la muestra y se determina comparando los resultados con niveles múltiples del analito a concentraciones conocidas; mientras más se aproxime a una línea recta, mayor será la linearidad de la prueba, como puede observarse en la *figura I*.

Exactitud

Una prueba de carga viral es exacta en el grado en que concuerda con un valor real o uno de referencia. Las diferentes técnicas disponibles no son *comparables entre sí* ya que los métodos utilizados para caracterizar las curvas estándar de referencia como densidad de partículas por microscopia electrónica de virus cultivados o cuantificación de síntesis de transcripciones son efectuadas por múltiples métodos independientes, por ello los *estudios longitudinales* de pacientes deberán de realizarse con un solo tipo de pruebas.^{9,26,27}

Precisión y tolerancia

El límite de tolerancia (o límite de predicción o intervalo de tolerancia) es la diferencia entre dos muestras secuenciales de un paciente que pueden ser consideradas como significativamente diferentes, con algún intervalo de confianza, usualmente

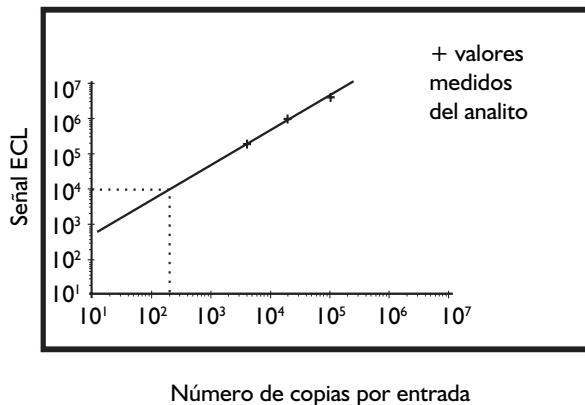


Figura 1.

95%, atributo en relación directa a la precisión de la prueba; se han reportado límites de tolerancia de 0.5 logaritmos, esto lleva directamente al concepto de cambio significativo, un cambio por ejemplo de 10,000 a 20 000 copias por mL (0.3 log) no lo es; de 10,000 a 40,000 copias por mL sí (0.6 log); de 98,000 a 63,000 o a 110,000 no (0.3 log).

Resulta evidente la necesidad de manejar exclusivamente datos logarítmicos y no numéricos.²⁻⁸

Sensibilidad

La sensibilidad de estas pruebas se reporta en términos de *límite de cuantificación* o *límite de detección*²⁸ y es la menor concentración del analito que uno puede discriminar pero no necesariamente cuantificar con precisión; este término es de suma importancia en la terapia antirretroviral y el laboratorio deberá de informar al clínico cuál está utilizando, ya que las diferentes pruebas varían en su sensibilidad. Las pruebas de carga viral tienden a ser imprecisas cerca de su límite de detección. Los inhibidores enzimáticos tienen mayor efecto al nivel más bajo, por lo que siempre deberán evaluarse en términos del volumen probado.

Especificidad

La especificidad de una prueba es su capacidad de medir solamente el analito que se intenta

medir. Las pruebas para medir carga viral *no han sido diseñadas para confirmar la infección con el HIV-1*; existen numerosas pruebas serológicas confirmatorias y de tamizaje diseñadas para este propósito, han sido probadas en poblaciones seronegativas y tienen especificidades mayores al 99.7% y las de carga viral del 95 al 98%; las falsas positivas pueden ser el resultado de contaminación y dar lugar a errores.²⁹ El reporte de ARN HIV-1 indetectable tiene una enorme importancia clínica y se refiere generalmente al componente plasmático; el laboratorio clínico deberá de informar al médico qué valor está considerando para este parámetro. Actualmente la sensibilidad para tres de estas pruebas es de 50 copias por mL.³⁰

Las variaciones del subtipo genético del HIV-1 pueden ocasionar una eficiencia disminuida y una cuantificación inadecuada del ARN viral. Se han reportado problemas significativos de cuantificación disminuida con subtipos diferentes al B, particularmente con los subtipos A y G obteniéndose valores más bajos a lo esperado.³¹

Variables posanalíticas

Variación

Se ha demostrado que los niveles del ARN HIV-1 plasmático varían cuando se les compara con los obtenidos por otros métodos de medición, incluyendo la cuantificación del HIV-1 cultivable en plasma de células mononucleares.^{9,26}

Interpretación

Dado que los datos de carga viral son lineales y el resultado de la replicación viral, deberá analizarse sólo *después de transformarse a logaritmo* únicamente cambios de 0.5 log son significativos. No todas las cargas virales indetectables son equivalentes, se debe conocer el límite de detección de cada una de ellas.²⁸⁻³⁰

Cuadro II. Relación de la distribución de la carga viral con respecto al sexo de los pacientes. Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional «La Raza».

Rango carga viral No. de copias/mL	Hombres		Mujeres		Total		Comparación de las proporciones por aprox. a distribución Z
	frecuencia	(%)	frecuencia	(%)	frecuencia	(%)	
0 a < LDL	245	14.3	39	13.4	284	14.1	son iguales p < 0.01
401 a 999	47	2.7	6	2.1	53	2.6	son iguales p < 0.01
1,000 a 1,999	56	3.3	12	4.1	68	3.4	son iguales p < 0.01
2,000 a 2,999	45	2.6	6	2.1	51	2.5	son iguales p < 0.01
3,000 a 3,999	34	2.0	9	3.1	43	2.1	son iguales p < 0.01
4,000 a 4,999	32	1.9	5	1.7	37	1.8	son iguales p < 0.01
5,000 a 5,999	26	1.5	3	1.0	29	1.4	son iguales p < 0.01
6,000 a 6,999	16	0.9	6	2.1	22	1.1	son iguales p < 0.01
7,000 a 7,999	29	1.7	3	1.0	32	1.6	son iguales p < 0.01
8,000 a 8,999	11	0.6	3	1.0	14	0.7	son iguales p < 0.01
9,000 a 9,999	18	1.0	1	0.3	19	0.9	son iguales p < 0.01
10,000 a 19,999	107	6.2	22	7.6	129	6.4	son iguales p < 0.01
20,000 a 29,999	69	4.0	17	5.8	86	4.3	son iguales p < 0.01
30,000 a 39,999	76	4.4	12	4.1	88	4.4	son iguales p < 0.01
40,000 a 49,999	57	3.3	15	5.2	72	3.6	son iguales p < 0.01
50,000 a 59,999	41	2.4	8	2.7	49	2.4	son iguales p < 0.01
60,000 a 69,999	35	2.0	4	1.4	39	1.9	son iguales p < 0.01
70,000 a 79,999	32	1.9	4	1.4	36	1.8	son iguales p < 0.01
80,000 a 89,999	26	1.5	8	2.7	34	1.7	son iguales p < 0.01
90,000 a 99,999	29	1.7	5	1.7	34	1.7	son iguales p < 0.01
100,000 a 199,999	189	11.0	29	10.0	218	10.9	son iguales p < 0.01
200,000 a 299,999	140	8.1	17	5.8	157	7.8	son iguales p < 0.01
300,000 a 399,999	70	4.1	11	3.8	81	4.0	son iguales p < 0.01
400,000 a 499,999	53	3.1	9	3.1	62	3.1	son iguales p < 0.01
500,000 a 599,999	41	2.4	6	2.1	47	2.3	son iguales p < 0.01
600,000 a 699,999	44	2.6	1	0.3	45	2.2	diferentes p < 0.05
700,000 a 799,999	34	2.0	3	1.0	37	1.8	son iguales p < 0.01
800,000 a 899,999	19	1.1	3	1.0	22	1.1	son iguales p < 0.01
900,000 a 999,999	12	0.7	0	0.0	12	0.6	son iguales p < 0.01
1 millón y mayores	85	4.9	24	8.2	109	5.4	diferentes p < 0.05
Total =	1,718		291		2,009	100	

En 2,009 pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, atendidos en el lapso de enero a julio de 1999, se realizó la determinación de carga viral con la técnica NASBA; doscientos noventa y uno correspondieron al sexo femenino y 1,718 al masculino; 14 fueron niños y 1,992 adultos. Se encontró que el mayor porcentaje de ellos tenía cifras por abajo del límite de detección de la prueba (14.1% menos de 400

copias por mL; 39.2% tenía cifras mayores a 100 mil copias por mL; y 5.4% cifras de un millón o mayores). La comparación de proporciones por distribución mostró sólo diferencias significativas entre ambos sexos en las cifras de 600,000 a 699,999 copias por mililitro que fue mayor en hombres 2.6% ($p < 0.05$), y en la de un millón o mayor, que fue más frecuente en mujeres 8.2% ($p < 0.05$) (cuadro II, figura 2).

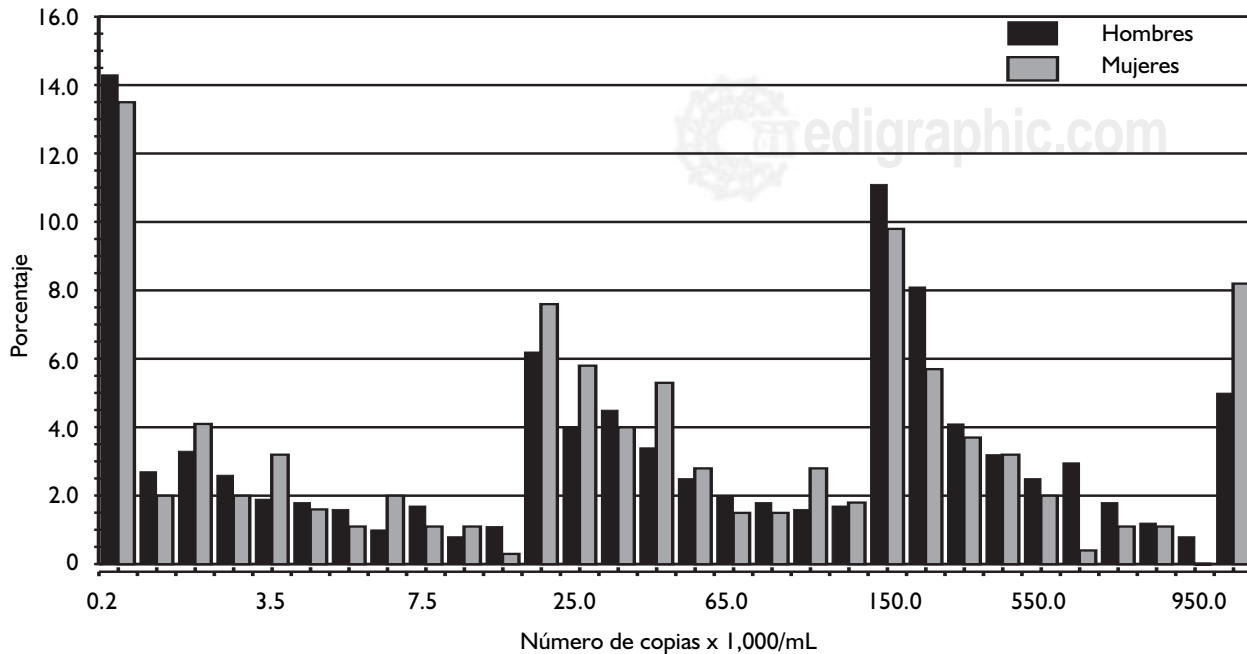


Figura 2. Distribución de la carga viral HIV con relación al sexo del paciente.

Conclusiones y recomendaciones

- 1) En la actualidad se dispone comercialmente en nuestro país de cuatro diferentes técnicas de amplificación del ARN del HIV-I, la elección de cuál realizar dependerá de las ventajas de cada una de ellas (*cuadro I*).
- 2) La prueba de carga viral no deberá de realizarse durante la fase aguda de infecciones intercurrentes, o después de vacunaciones o transfusiones, debiendo de transcurrir un mínimo de un mes después del evento para llevarla a cabo.
- 3) Las muestras para la determinación deberán de tomarse en condiciones de esterilidad y de preferencia utilizando como anticoagulante el EDTA.
- 4) El plasma para estudio deberá de separarse dentro de las primeras 4 horas después de haberse obtenido la muestra y congelarse a -70°C .
- 5) Dado que los resultados de las diferentes pruebas para determinar carga viral no son comparables entre sí en el seguimiento longitudinal de

los pacientes, deberá de utilizarse siempre la misma técnica y el mismo laboratorio.

- 6) En la interpretación del resultado del estudio únicamente deberán considerarse como *significativos* cambios de 0.5 de logaritmo o mayores, y no datos exclusivamente numéricos.
- 7) La prueba cuantitativa de carga viral no deberá de utilizarse como prueba confirmatoria dada la posibilidad de resultados falsos positivos.
- 8) Dada la variación en la sensibilidad de estas pruebas, el laboratorio deberá de informar claramente al clínico cuál es su límite exacto de *cuantificación o detección*.
- 9) Los subtipos genéticos del HIV-I diferentes al subtipo B afectan la cuantificación del ARN HIV-I viral, disminuyéndola.

Bibliografía

1. Magis RC, Bravo GE, Anaya LC, Uribe ZP. La situación del SIDA en México a finales de 1998. *SIDA/ETS* 1998; 4, 4, 143-155.

2. Salk J. Prospects for the control of AIDS by immunizing seropositive in individuals. *Nature* 1987; 327: 473-476.
3. Mellor JW, Kingsley LA, Rinaldo CRJ. Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion. *Ann Intern Med* 1995; 122: 573-579.
4. Ho DD, Moudgil T, Alam M. Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 in the blood of infected persons. *N Eng J Med* 1989; 321: 1621-1625.
5. Welles SL, Jackson JB, Yen-Lieberman P. Prognostic value of plasma human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) RNA levels in patients with advanced HIV-1 disease and with little or no prior zidovudine therapy. *J Infect Dis* 1996; 174: 696-703
6. Aboulker JP, Babiker AG, Flande P et al. An evaluation of HIV RNA and CD4 cell count as surrogates for clinical outcome. *AIDS* 1999; 13, 565-573.
7. Aboulker JP, Babiker AG, Brun VF et al. HIV RNA response to antiretroviral treatment in 1,280 participants in the Delta trial: an extended virologic study. *AIDS* 1999 13, 57-66.
8. Ho DD, Neumann AU, Perelson AS. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature* 1995; 373, 123-126.
9. Castillo TNP, Barriga AG, Solís TM, Arumir EC. Carga viral en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Estudio comparativo de tres métodos. *Rev Mex Patol Clin* 1998; 45: 3, 155-158.
10. Van Gemen B, Kievits T, Schukink R. Quantification of HIV-1 RNA in plasma using NASBA TM during HIV primary infection. *J Virol Methods* 1993; 43: 177-178.
11. Vandame AM, Schmit JC, Van Douren S. Quantification of HIV-1 RNA in plasma: Comparable results with the NASBA HIV-1 RNA QT and the Amplicor HIV Monitor test. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13: 127-139.
12. Revets H, Marissens D, De Wit S. 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: 1058-1064.
13. Schuurman R, Descamps D, Weverling GJ. Multicenter comparison of three commercial methods for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 3016-3022.
14. Bush CE, Donovan RM, Markowitz NP. A study of HIV RNA viral load in AIDS patients with bacterial pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 13: 23-26.
15. Mole L, Ripich S, Margolis D. The impact of active, herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis* 1997; 176: 766-778.
16. Donova RM, Moore E, Bush CE. Changes in plasma HIV RNA levels and CD4 cell counts after vaccination of pediatric patients. *AIDS* 1997; 11: 1054-1056.
17. O'Brien WA, Grovit FK, Namazi A. Human immunodeficiency virus type 1 replication can be increased in peripheral blood of seropositive patients after influenza vaccination. *Blood* 1995; 86: 1082-1089.
18. Claydon EJ, Bennett J, Gor B. Transient elevation of serum HIV antigen levels associated with intercurrent infection. *AIDS* 1991; 5: 113-114.
19. Stapran SI, Hamilton BL, Follanshee SE. Activation of virus replication after vaccination of HIV-1 infected individuals. *J Exp Med* 1995; 182: 1727-1737.
20. Mole L, Ripich S, Margolis D. The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis* 1997; 17: 766-770.
21. Raboud JM, Montaner JSG, Conway B. Variation in plasma RNA levels, CD4 cell counts, and p24 antigen levels in clinically stable men with human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1996; 174: 191-194.
22. Holodniy M, Mole L, Winters M. Diurnal and short term stability of HIV virus load measure by gene amplification. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1994; 7: 363-368.
23. Ginocchio CC, Nancy TP, Kaplan MH. 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.
24. Holodniy M, Kim S, Katzenstein D. Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 676-679.
25. 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.
26. Collin ML, Zayati C, Detmer JJ. Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays. *Anal Biochem* 1995; 226: 120-129.
27. Yen LB, Brambila D, Jackson B. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS clinical trials group virology laboratories. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 2695-2701.
28. Armbruster DA, Tillman MD, Hubbs LM. Limit of detection (LOD) limit of quantitation (LOQ): comparison of the empirical and the statistical methods exemplified with GC-MS assays of abused drugs. *Clin Chem* 1994; 40: 1233-123.
29. Schwartz DH, Laeyendecker OB, Arango JS. Extensive evaluation of a seronegative participant in an HIV-1 vaccine trial as a result of false positive PCR. *Lancet* 1997; 350: 256-259.
30. Dunne AL, Crowe SM. Comparison of branched DNA and reverse transcriptase polymerase chain reaction for quantifying six different HIV-1 subtypes in plasma. *AIDS* 1997; 11: 126-127.
31. Coste J, Montes B, Reynes J. Effect of HIV-1 genetic diversity of HIV-1 RNA quantification in plasma comparative evaluation of three commercial assays. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1997; 15: 174-175.