

Desarrollo de un sistema de diagnóstico molecular para la detección cualitativa del ARN del virus de la Hepatitis C

Yaimé Josefina González González,¹ Idania González Pérez,¹ Ariel Viña Rodríguez,² Anny Armas Cayarga,² Iria García de la Rosa,² Rosa Lydia Solís Rodríguez³

¹Laboratorio de Biología Molecular. Subdirección de Inmunoquímica. Centro de Inmunoensayo (CIE), Calle 134 y Ave 25, Apartado Postal 6653, Cubanacán, Playa, Ciudad de la Habana, Cuba. Telf.: (53-7) 208 2929; Fax: (53-7) 208 6800; E-mail: iqbmolecular@cie.sld.cu

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Ave 31 e/ 158 y 190, Apartado Postal 6162, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. ³Instituto Carlos J. Finlay, Ave 27 # 19802 e/ 198 y 202, Siboney, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

RESUMEN

Hasta el momento Cuba no contaba con un sistema confirmatorio de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) en aquellas personas seropositivas a la prueba de anticuerpos, ni podía detectar la infección en el período de ventana que media entre la infección y la seroconversión; por otro lado la adquisición de estos sistemas diagnósticos en el mercado internacional es limitada por ser excesivamente costosos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema diagnóstico por Biología Molecular, con reactivos y tecnología propia adaptado al SUMA, al menor costo posible y factible de insertar en nuestro sistema de salud. Como resultado se desarrolló un sistema que denominamos: UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO, el cual consta de tres etapas:

1. Extracción del ARN del suero o plasma humano: Optimización del método del fenol-cloroformo modificando reduciendo los volúmenes de muestras y reactivos a la mitad y tiempo de reacción de 18 a 3 horas con muy buena sensibilidad.
2. Amplificación en dos pasos: Transcripción Inversa(RT)-Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR anidada. Optimización de volúmenes de enzimas, temperaturas y ciclos de ensayo.
3. Hibridación en fase sólida: Emplea menos de 10 µL del producto amplificado y una sonda no reportada anteriormente en la literatura.

El ensayo es un sistema robusto, con una especificidad de 100%, sensibilidad de 101,7 UI/mL, así como concordancia de 100% contra el sistema comercial Amplicor HCV Test. Además es el primer ensayo de diagnóstico molecular desarrollado y registrado en nuestro país, lo cual sirve de base para nuevos ensayos con esta metodología.

Introducción

En el presente trabajo se desarrolló un ensayo cualitativo *in vitro* para el diagnóstico molecular del ARN del virus de la hepatitis C (VHC) en suero o plasma humanos, basado en la tecnología de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ensayo de detección es una hibridación adaptada a la tecnología SUMA, disponible en bancos de sangre y la red nacional de salud.

Este sistema diagnóstico que denominamos: UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO tiene como logros científicos, la optimización de los ensayos en cuanto a procedimientos, reactivos, volúmenes, etc, así como el diseño de un ensayo de hibridación en fase sólida con una nueva sonda (no reportada) y metodologías para lograr un producto de alta calidad, con bajo costo y competitivo en el mercado internacional (Figura 1).

Materiales y Métodos

1. Extracción del ARN viral de la muestra: para extraer el ARN del VHC de suero o plasma humano se partió del método del fenol-cloroformo de Chomczynski (BioTechniques, Vol.15,Nº 3, 1993, p. 532), el cual se modificó en cuanto a volúmenes, tiempo de ensayo y complejidad.
2. Transcripción inversa-amplificación (RT-PCR) y PCR anidada: del ARN extraído se obtiene un ADN copia (ADNc) por transcripción inversa y éste se amplifica por el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), KB.Mullis (Methods Enzymol, Vol. 155, 1987, p.335). Poste-

Diagrama general del ensayo UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO

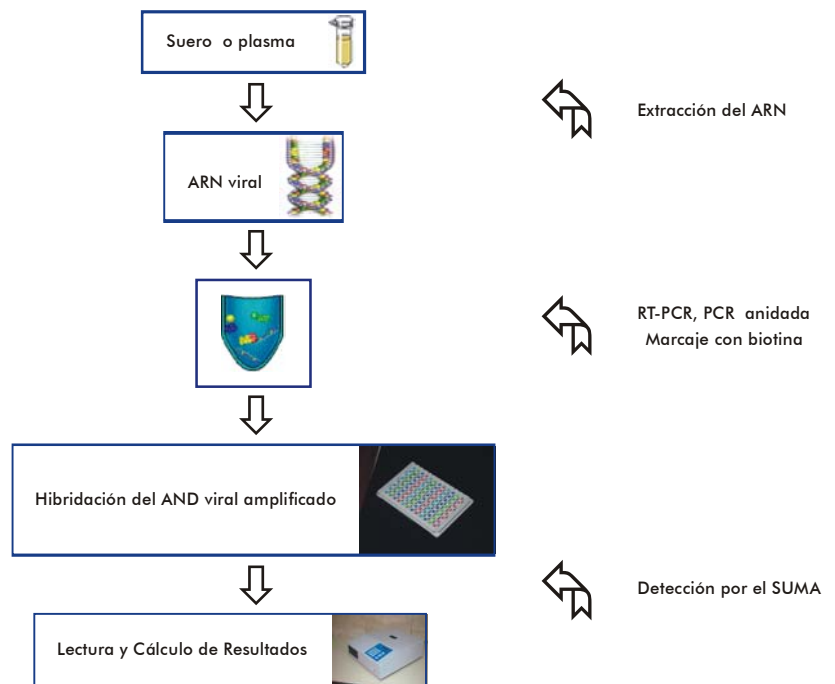


Figura 1.

riormente se realiza una ronda de PCR anidada según método de HA.Erlich (Science, Vol.252,1991, p.1643). Ambos métodos se optimizaron en cuanto a concentraciones de enzimas, cebadores, etc.; volúmenes de reacción y temperaturas.

- Hibridación y detección del producto amplificado: Se desarrolló un ensayo de hibridación en fase sólida tipo ELOSA (enzyme linked oligosorbent assay) en el formato ultramicroanalítico, con detección fluorescente compatible con el SUMA y se optimizaron todos sus pasos.
- Protocolo de Validación Interna y Externa del ensayo: se evaluó especificidad, sensibilidad y robustez según las Guías de Validación para técnicas de detección de ácidos nucleicos (NAT), (EDQM, date of entry into force October 1999). Se utilizaron: un panel de referencia con los genotipos 1 y 3, *Pellicheck HCV-RNA sensitivity panel* (No.S2004, CLB: Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service), el Control de Corrida del NIBSC, genotipo 3: RC 96/586 y el Estándar Internacional de la OMS (EI) para ARN de VHC, WHO 96/790, así como el estuche de referencia: AMPLICOR® Hepatitis C Virus (HCV) Test (version 2.0), para los estudios de concordancia (Figura 2).

Descripción del Ensayo y Resultados de la Optimización

Extracción: extracción del ARN de la muestra

El ARN del VHC se aísla a partir de suero o plasma humano empleando una modificación optimizada del método del fenol-cloroformo, mediante lisis de los viriones con agentes caotrópicos y precipitación del ARN en isopropanol. Luego se lava con etanol al 75%, los restos de solvente se extraen con acetona y el ARN se resuspende en agua libre de ribonucleasas. El método tradicional consta de 21 pasos con 18 horas de ensayo (3 días), y se redujo a 16 pasos sencillos y 3 horas, además de reducir los volúmenes de muestras y reactivos a la mitad.

Amplificación: transcripción inversa-amplificación (RT-PCR) y PCR anidada

El ARN extraído se mezcla con las enzimas y los cebadores y se incuban en un secuenciador térmico donde ocurre primero una transcripción inversa por la transcriptasa inversa del virus de la Mieloblastosis Aviar (AMV) produciéndose una copia de ADN a partir de cada cadena simple de ARN. Posteriormente ocurre una amplificación cíclica (PCR), donde se desnaturalizan todos los híbridos ARN-ADNc por calentamiento y se realizan varios ciclos de desnaturalización, hibridación de los iniciadores a las cadenas simples de ADNc y elongación por la Taq polimerasa hasta obtener millones de copias de la secuencia blanco amplificada (amplicones). La secuencia de los cebadores estaba reportada (GENSET, Francia), pero al estudiar la sensibilidad del sistema para diferentes genotipos se detectó que era muy baja con uno de ellos y se rediseñó su secuencia, lográndose aumentar 100 veces la sensibilidad del ensayo.

La PCR anidada se realiza con el objetivo de aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo.

Para ello una parte del ADN amplificado se une a otros cebadores (uno de los cuales está biotinilado para hacer posible la detección en la hibridación) y se vuelve a amplificar durante 40 ciclos. Como resultado de la PCR se obtienen nuevos amplicones internos al fragmento obtenido en la primera amplificación, cuya longitud está acotada por los cebadores.

Ambos métodos se optimizaron en cuanto a concentraciones de enzimas, cebadores, nucleótidos, lográndose disminuir en algunos casos hasta 10 veces la cantidad usada habitualmente, se ajustó la concentración óptima del cloruro de magnesio de acuerdo al virus en estudio. También se redujeron los volúmenes de reacción de 100 ó 50 μ L a 30 μ L, se optimizó la temperatura de unión de los cebadores de acuerdo a su secuencia y se prepararon las mezclas de reacción listas para el uso, para disminuir los riesgos de contaminación.

Detección: hibridación y detección del producto amplificado utilizando la tecnología SUMA

El sistema de detección UMELOSA® HCV CUALITATIVO es un ensayo de hibridación en fase sólida, cuyo principio no difiere de un ELISA tipo sándwich, excepto que los pocillos en la placa de tiras están recubiertos con una sonda consistente en un oligonucleótido correspondiente a la región 5' no codificadora (5'NC) del VHC. Las muestras provenientes de la PCR anidada se desnaturalizan y se incuban con una solución de hibridación en los pocillos de la ultramicroplaca de tiras. En caso de reacción positiva, el ADN amplificado y marcado con



Figura 1.

biotina hibridará por complementariedad de bases a la sonda de captura y el conjugado Estreptavidina / Fosfatasa Alcalina, unido a la biotina, producirá la hidrólisis del sustrato 4-Metilumbeliferil fosfato, permitiendo la detección del amplicón, al producirse una señal fluorescente que será detectada por un lector de la tecnología SUMA, donde se realizará el análisis de los resultados.

Los principales aportes dentro de este método son la optimización de la concentración del buffer de lavado, de las soluciones de hibridación y neutralización así como su aplicación en un solo paso. Adición de un indicador de pH a la solución de desnaturalización (pH básico), que permite observar un cambio de coloración al neutralizarse la mezcla (pH neutro). Se diseñó la sonda de captura unida a un grupo NH₂ por el extremo 5', para facilitar su unión a la fase sólida.

El sistema UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO contiene reactivos suficientes para 96 determinaciones duplicadas y está conformado por los estuches de EXTRACCIÓN, AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN.

Resultados de la Validación y Conclusiones

El sistema se evaluó según las Guías de Validación para ensayos NAT obteniéndose los siguientes resultados:

1. El sistema UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO puede ser usado con sueros y plasmas obtenidos con ACD o EDTA pero nunca con heparina que inhibe la PCR.
2. El ensayo tiene una buena especificidad y no tiene reactividad cruzada con muestras positivas para VIH de los tipos 1 y 2, VHA, VHB y HTLV.
3. Cumple con los límites de detección del 95%, (LD 95%) de 5000 UI/mL y 5000 cop/mL equivalentes a 1250 UI/mL, requeridas según las normas europea y norteamericana respectivamente, para pruebas de bolsas unitarias de sangre.
4. El LD 95% de 101,7 UI/mL (IC 95% de 81,0 a 162,8 UI/mL) obtenido para el ensayo, es muy cercano a las 100 UI/mL, requeridas en Europa para los ensayos NAT utilizados en la pesquisa de mezclas de plasma para la manufactura de hemoderivados. El EI de la OMS a una concentración de 100 UI/mL fue detectado el 88% de las veces ensayadas.
5. El estuche UMELOSA, comparado con el AMPLICOR[®] Hepatitis C Virus (HCV) Test, mostró 100% de concordancia, es decir resultados idénticos para todas las muestras. Con el RC el UMELOSA tuvo mejor desempeño que el AMPLICOR, que mostró resultados ligeramente superiores con el panel Pelicheck y el EI.
6. En las pruebas de robustez realizadas, las 24 muestras positivas bajas, ensayadas en diferentes condiciones, resultaron positivas. No hubo contaminación cruzada entre las muestras negativas intercaladas entre muestras positivas con alta concentración de ARN.

Consideramos que el ensayo es robusto y que cumple con los requerimientos de sensibilidad y especificidad para ser usado como prueba confirmatoria, el monitoreo de terapia y para la pesquisa de mezclas de plasma para hemoderivados, si el número

de bolsas a mezclar es regulado de acuerdo a la sensibilidad del ensayo.

Aplicaciones

Estudio de tasa real de positivos en Bancos de Sangre

Para determinar la tasa real de infección por VHC en donantes de sangre, se realizó un pequeño estudio con 40 donantes anti-VHC positivos, procedentes de dos bancos de Ciudad de la Habana. El ARN del VHC fue detectado sólo en 21 de las 40 muestras repetidamente positivas al UMELISA HCV, para un 52,5% de casos realmente infectados. Este resultado coincide con los reportados para estudios similares realizados en otros países.

Pruebas de confirmación

Se han realizado, hasta octubre del 2002, 162 pruebas de confirmación provenientes de diferentes consultas, de las cuales 76 resultaron positivas para un 47 % de casos positivos, lo cual se acerca a los resultados obtenidos en el estudio antes mencionado.

Seguimiento de pacientes en tratamiento

De la consulta de gastroenterología del Hospital Calixto García se analizaron, hasta octubre del 2002, muestras de 45 pacientes. Se han apoyado las consultas de inmunología de la Escuela de Medicina "Victoria de Girón," de gastroenterología del Hospital Militar Finlay, del Instituto de Gastroenterología (IGE) y del CIMEQ para un total de 153 pacientes y 206 determinaciones, la diferencia se debe a que se han realizado varias pruebas al mismo paciente durante el seguimiento de la terapia.

Actualmente se están evaluando dos protocolos de ensayos clínicos: "Terapia de inducción con Interferón (IFN) alfa 2B recombinante asociado a Ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C", Instituto de Gastroenterología: con 61 pacientes evaluados hasta el momento, 17 de ellos como prueba confirmatoria y 44 para comprobar la eficacia antiviral del tratamiento. El otro protocolo es del grupo de Ensayos Clínicos del CIGB: "Empleo de la terapia combinada de Interferón (IFN) alfa 2B recombinante y Ribavirina como primer tratamiento de la lesión hepática crónica por el virus de la hepatitis C": con 28 pacientes incluidos para un total de 30 determinaciones.

Confirmación y seguimiento de pacientes sometidos a trasplante hepático y renal en el CIMEQ: Desde septiembre de 1999 hasta octubre del 2002 se han estudiado 100 muestras de las cuales 54 han sido para confirmación diagnóstica y 46 de pacientes de trasplante hepático o pendientes al mismo. Se han realizado 7 determinaciones a igual número de pacientes de trasplante renal o pendientes de realizarlo.

Impacto Científico, Social y Económico

La introducción del ensayo UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO en nuestra red nacional de salud, como sistema confirmatorio complementario al UMELISA HCV para la detección de anticuerpos contra el VHC,

es de gran importancia para la exclusión de los falsos positivos obtenidos en la pesquisa en bancos.

La ventaja fundamental de este ensayo es que al detectar el ARN del virus, permite demostrar que la infección está presente y que el virus está en replicación, por lo que constituye la prueba más específica para el diagnóstico de la enfermedad, permitiendo, a diferencia de los ensayos serológicos: detectar la infección en el período de ventana existente entre infección y seroconversión; realizar el diagnóstico en personas inmunodeprimidas y definir los casos de infecciones resueltas: seropositivos que no tienen replicación activa.

La disponibilidad de esta técnica en nuestro país tiene un gran valor social y económico. Hasta el momento Cuba no contaba con un sistema confirmatorio de la infección por el virus de la hepatitis C en aquellas personas seropositivas a la prueba de anticuerpos, ni podía detectar la infección en el período de ventana que media entre la infección y la seroconversión; por otro lado la adquisición de estos sistemas diagnósticos en el mercado internacional es limitada por ser excesivamente costosos, pues el precio de una determinación es de aproximadamente 70 USD, a diferencia del estuche UMELOSA, cuyo costo por determinación es casi tres veces menor.

La introducción en la red nacional de salud de esta técnica permitirá que los seropositivos al VHC, negativos al UMELOSA, no sean sometidos a la biopsia hepática, que es un proceder riesgoso, con aparición de complicaciones mortales en el 1% de los casos y con un costo de 250 USD si se realiza por Laparoscopia, requiriendo además que el paciente sea hospitalizado por lo que tiene implicaciones en la estabilidad laboral. La aplicación de esta novedosa técnica diagnóstica en nuestro país tendrá una importante repercusión, en la indicación de terapia y seguimiento de pacientes en tratamiento. Sólo en bancos de sangre, aproximadamente el 40% de los donantes que resultan positivos al UMELOSA HCV no están realmente infectados con el virus, resultando negativos a la prueba UMELOSA para la detección del ARN viral y un grupo elevado de éstas personas son tratadas sin una confirmación de la replicación activa del virus. Es importante señalar que el resultado de la biopsia hepática, no es específico para el diagnóstico de infección por VHC ni para el seguimiento de terapia, pues hay otras dolencias que también dañan el tejido hepático y alteran los niveles de ALT, por tanto, una biopsia positiva no es suficiente para prescribir una terapia antiviral contra el VHC. El diagnóstico de esas enfermedades requiere de muchos análisis complementarios, por lo que se recomienda primero confirmar VHC por técnicas moleculares, para definir quién está infectado realmente y necesita ser sometido a tratamiento y quién no.

Al 60% restante, con replicación viral confirmada, luego de ser sometidos a las pruebas que permitan determinar el estadio de la enfermedad se le indicaría el tratamiento adecuado, por lo que se benefician con este análisis, pues todo los recursos que se invierten en la terapia se concentrarían en ellos, permitiendo un uso más racional de los medicamentos antivirales, sobre todo si se considera que las terapias con IFN o IFN combinado con Ribavirina desencadenan reacciones secundarias muy fuertes en los pacientes y son muy costosas; en el mercado internacional un esquema estándar de tratamiento, por 48 semanas, con IFN y Ribavirina, tiene un costo de 10 500 USD aproximadamente y puede llegar hasta los 15 000 USD.

La Dirección Nacional de Higiene y Epidemiología en coordinación con los gastroenterólogos definieron los grupos de pacientes para los cuales es indispensable la realización de esta prueba: pacientes inmunodeprimidos: enfermos de SIDA, hemodializados, pacientes trasplantados: riñón, hígado, etc.; hijos de madres portadoras del VHC, niños positivos a la prueba anti-VHC y/o hemofílicos; pacientes con hepatitis aguda y crónica; pacientes con crioglobulinemia.

Publicaciones Asociadas

1. Validation of a nested PCR assay UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO for detection of Hepatitis C Virus. (Idania González Pérez, Yaimé Josefina González González, Anny Armas Cayarga, Ariel Viña Rodríguez, Ariel Medina Concepción, Niurka Trujillo Pelegrín, María Teresa Pérez Guevara and Rosa Lydia Solís Rodríguez) Publicado en la Revista Biologicals Vol. 31 No. 1, pp 55-61.
2. The Usefulness of UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO kit as supplemental test for confirmation of HCV infection. (Idania González Pérez, Yaimé Josefina González González, Ariel Viña Rodríguez, Anny Armas Cayarga and Rosa Lidia Solís Rodríguez) En revisión en la Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
3. Design of an antisense RT-PCR primer efficient for all hepatitis C virus genotypes. Comparison of its performance vs. a commercial primer. (Idania González Pérez, Ariel Viña Rodríguez, Anny Armas Cayarga, Iria García de la Rosa and Yaimé Josefina González González) Publicado en la Revista Analytical Biochemistry Vol. 315 No. 2, pp 281.

Colaboradores

Carlos Silva León, Enny Morales Rodríguez, Vivian Alonso Ramos, Adriana González Quintero, Niurka Carlos Pía, Ariel Medina Concepción, María Teresa Pérez Guevara, Niurka Trujillo Pelegrín.