

Diagnóstico molecular de la infección por el virus de la hepatitis C mediante PCR en tiempo real

Celis Gandica-Vargas¹, Javier Hernández-Peñaloza¹, Leidith Berrueta-Carrillo¹,
Melisa Colmenares¹, Luisa Barboza¹, Henry Montes², Siham Salmen¹, Lisbeth Berrueta¹.

¹Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela;
²Centro Ambulatorio de Medicina Integral, Universidad de Los Andes, CAMIULA, Mérida, Venezuela

Recibido Marzo 15, 2009. Aceptado Marzo 28, 2009

MOLECULAR DIAGNOSTIC OF HEPATITIS C VIRUS INFECTION BY REAL TIME-PCR.

Resumen

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) actualmente es considerada una de las principales causas de enfermedad hepática. Su principal vía de transmisión es la exposición a productos sanguíneos mediante transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos o por el uso de drogas endovenosas, siendo responsable del 85-90% de las hepatitis postransfusionales. El objetivo de este estudio fue implementar la transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), para la detección y cuantificación de la replicación del VHC, herramienta necesaria para el diagnóstico y monitoreo de los pacientes en terapia antiviral. Se concluye que la técnica de RT-PCR en presencia de SYBR-Green es rápida, sensible y específica, ya que evita el uso de la electroforesis y otros procedimientos laboriosos durante la fase de detección, representando así, una herramienta poderosa en la práctica clínica.

PALABRAS CLAVE: VHC, RT-PCR, SYBR Green, carga viral

Abstract

The hepatitis C virus (HCV) infection is considered worldwide as one of the main causes of liver disease. HCV is transmitted most efficiently by exposure to blood or related products, which include blood transfusion, transplantation of infected organs, and intravenous drug abuse, being responsible for 85-90% of post-transfusional hepatitis. In this study, we used real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay to detect and quantify HCV replication, a procedure necessary for diagnosis of viral infection and monitoring patients on antiviral therapy. We conclude that SYBR-Green real-time RT-PCR could be easily and reliably applicable, avoiding the use of laborious and time-consuming electrophoresis techniques during the detection steps, representing a powerful diagnostic tool in clinical practice.

KEY WORDS: HCV, RT-PCR, SYBR-Green, viral load

Introducción

La hepatitis C afecta a más de 170 millones de personas en el mundo y es la causa más común de enfermedad hepática crónica (1). En la actualidad está claramente establecido que el virus de la hepatitis C (VHC) representa el principal agente etiológico responsable de la gran mayoría de los casos de hepatitis postransfusionales y esporádicas a nivel mundial (2). Su identificación mediante técnicas de biología molecular ha permitido no solo su caracterización estructural, sino también el desarrollo de ensayos serológicos y moleculares que actualmente son utilizados para el diagnóstico y estudio de esta infección viral crónica (3). Numerosos individuos infectados con el VHC no tienen ningún factor de riesgo obvio, y se asume

que la mayoría de estas personas se han expuesto al virus probablemente de manera inadvertida, a la sangre contaminada o a productos de la misma (2).

En Venezuela los datos preliminares reportan una prevalencia de la infección por el VHC de 1,2%, dos veces superior a la reportada en la mayoría de los países industrializados (4) y puede variar dependiendo de la población a riesgo en respuesta a productos sanguíneos, evidenciándose una elevada prevalencia del anti-VHC en pacientes hemofílicos en el Estado Mérida, reportada del 30% (5), similar a la detectada en Maracaibo (6), la cual es relativamente baja comparada con la referida internacionalmente (7). Por otro lado, la prevalencia de la infección de VHC en pacientes con insuficiencia renal crónica estudiados también en el estado Mérida (22.7%) (8), es similar a las

obtenidas por Zeldis et al. (15.7%) en Estados Unidos (9) y las de Esteban et al. (20%) en España (7).

La utilidad clínica de la cuantificación del ARN del VHC ha sido bien establecida, siendo el monitoreo de la carga viral antes, durante y después de la terapia, crítica para el manejo de estos pacientes (10). Es por ello que en este trabajo nos propusimos establecer las bases para la implementación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para la detección y cuantificación de la infección por el VHC, como herramienta fundamental en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la infección viral.

Material y métodos

Pacientes. Para este estudio se seleccionó un grupo de 11 pacientes procedentes de las consultas de gastroenterología del Centro Ambulatorio de Medicina Integral de la Universidad de Los Andes (CAMIULA), a quienes se les extrajeron 10 ml de sangre periférica sin anticoagulante para la separación de los sueros, los mismos fueron almacenados a -30°C . Estos pacientes fueron previamente diagnosticados con serología positiva para la infección por el VHC. Se incluyeron 8 individuos sanos relacionados o no con los pacientes. Los controles y familiares admitidos fueron negativos para el VHC, virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis B (VHB), citomegalovirus (CMV) y virus de Epstein-Barr (VEB). Los pacientes no se encontraban bajo tratamiento anti-viral para el momento del estudio. Todas las personas incluidas en este trabajo fueron notificadas del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito siguiendo las normas del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes.

Pruebas serológicas. El diagnóstico de la infección por el VHC se realizó mediante la detección de IgG contra los antígenos del core, NS3, NS4 y NS5 a través del ensayo inmunoenzimático (EIA) de IV generación (InnotestTM, Innogenetics NV). La detección de la infección por VIH se llevó a cabo utilizando un EIA de IV generación. La detección de anticuerpos

anti-VHB se realizó por ELISA (Organon Teknike, Boxtel, NL, USA) y las infecciones recientes por CMV y EBV se descartaron utilizando EIA para detectar IgM específica para cada virus (Organon Teknike, Boxtel, NL, USA).

Preparación y purificación del ARN viral. Para la extracción del ARN viral se siguieron las instrucciones de la casa comercial, Axigen Biosciences, USA. Brevemente, a 250 μl de suero se le añadieron 500 μl de buffer V-A, incubándose a temperatura ambiente durante 5 min, seguido por la adición de 125 μl del buffer AP2 y del buffer V-B para luego mezclarlo vigorosamente, transferirlo a las columnas de purificación y centrifugarlo a 5000 rpm durante 1 min. Después de 2 lavados con los amortiguadores WA1 y W2, la muestra se eluyó con 60 μl de buffer TE contentivo de inhibidor de RNasa (RNasin) (1 unidad/ μl).

RT-PCR en tiempo real para la cuantificación del VHC. La cuantificación del genoma viral se realizó utilizando el sistema que combina las enzimas Super Sript III transcriptasa reversa (RT) y la Platinum *taq* ADN polimerasa, en presencia de *SYBR Green I* de Invitrogen, USA. Tanto para la síntesis del ADNc como para la PCR, se utilizaron las mismas sondas dirigidas contra genes específicos (sentido 5' - GTC TAG CCA TGG CGT TAG TAT GAG - 3' (77-100; HCVP1) y antisentido, 5' - ACC CTA TCA GGC AGT ACC ACA AG - 3' (abarcando el segmento 302 hasta 280 del HCVP2) ambos *primers* en una concentración de 10 μM . Las muestras se colocaron a 50°C por 3 min (paso donde comienza la síntesis del ADNc), seguido de una incubación a 95°C , durante 5 min. Posteriormente, se realizaron 40 ciclos de: 94°C por 5 seg, 60°C por 15 seg, 72°C por 30 seg. Finalmente un ciclo a 78°C por 3 seg. Para obtener la curva de fusión (*melting curve*), la muestra fue expuesta a un incremento progresivo de la temperatura desde 72°C hasta 95°C generando una lectura cada 0.2°C sostenido por 1 seg. En paralelo se utilizó un estándar de concentración conocida (ACURRUN 325, BBI Diagnostic, Boston USA) para de esta manera establecer una curva de regresión lineal y obtener la concentración del virus en copias/ml (Opticon3, Inc).

Análisis estadístico. Los resultados se expresan como la media \pm desviación estándar (DS). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $p < 0,05$.

Resultados y Discusión

La RT-PCR realizada a través de la detección de marcadores fluorescentes es una de las tecnologías más versátiles de la era genómica y se ha convertido en el método de elección para la detección de ARN. Varios factores han contribuido a que dicha tecnología represente actualmente una piedra angular tanto en el área de investigación como en el diagnóstico molecular: a) evita los requerimientos de procesamiento del producto amplificado una vez finalizado el PCR, b) posee un amplio rango dinámico de detección de cantidades mínimas de ARN con excelente poder de resolución, y c) permite analizar al mismo tiempo parámetros cualitativos y cuantitativos del ARN o ADN en una muestra problema. Estas ventajas indudablemente han favorecido la utilización de esta técnica para estudios funcionales en genómica, medicina molecular, medicina forense, virología, microbiología y biotecnología (11).

En este trabajo se implementó esta tecnología para obtener una medición cuantitativa del VHC en muestras de suero de pacientes infectados y permitió detectar de manera reproducible el número de copias virales en muestras previamente conocidas como positivas para la infección por el VHC, pudiendo además diferenciar entre otras muestras negativas para el virus. Siguiendo todos los requisitos para la separación de muestras y extracción del material genómico en ambientes físicamente separados, las muestras previamente preparadas, se dispusieron en un soporte especial para la realización de la RT-PCR. Se incluyeron muestras positivas y negativas con número de copias previamente determinados además del blanco para la mezcla de reacción.

En la tabla 1 se resumen los datos de la valoración clínica de los individuos infectados

crónicos. Como puede observarse en general la población estudiada presentaba un cuadro inflamatorio hepático a juzgar por los niveles elevados de las enzimas hepáticas.

Del grupo de pacientes estudiados (11 en total) 9 resultaron positivos. Para determinar estos resultados se tomaron como referencia los valores obtenidos de la curva de disociación o de fusión, considerando el valor de la *T_m* o temperatura *melting*, superior a 85 como positivo (Figs. 1 y 2), punto en el cual se detectó en forma específica el grupo de amplicones correspondientes al segmento que se buscaba identificar a través de las sondas específicas utilizadas, con una declinación marcada de la fluorescencia del resto de las muestras que representaban uniones inespecíficas.

Es notorio destacar que todos los pacientes resultaron positivos por ELISA, sin embargo dos de ellos se registraron como negativos en la RT-PCR; esto se debe probablemente a que los pacientes se recuperaron de la infección (crearon anticuerpos contra el virus) o su sistema inmune ha sido capaz de controlar la replicación viral a pesar de no eliminar definitivamente la infección por VHC (12); por este motivo cuando se realizó la RT-PCR no hubo una detección de carga viral significativa. El promedio de copias de los pacientes considerados como positivos fue de $3,5 \times 10^8$ copias/ml relacionándose positivamente con la efectividad y sensibilidad esperada en la amplificación del genoma viral a través de la técnica de PCR.

El uso de la RT-PCR es una herramienta útil para propósitos de diagnóstico, clasificación clínica y seguimiento de pacientes infectados por VHC, que además muestra ser altamente sensible, específica y rápida (13). Dicha técnica no solo ha permitido mejorar la sensibilidad de detección de un genoma viral sino que también ha evidenciado

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes crónicamente infectados

Edad (años)	Sexo (F/M)	ALT (U/L)	AST (U/L)	GGT (U/mL)	Carga viral (copias/ml)
59,5 ± 11,80	6/5	73 ± 35,2	56,6 ± 29,9	84 + 43,9	3,5x10 ⁸ ± 6,1x10 ⁷

Los valores representan la media más o menos la desviación estándar.

ALT, alanina amino transferasa; valores normales: 5-45 U/L. AST, aspartato amino transferasa; valores normales: 9-40 U/L. GGT, gamma-glutamyl transpeptidasa; valores normales: 75-200 U/L.

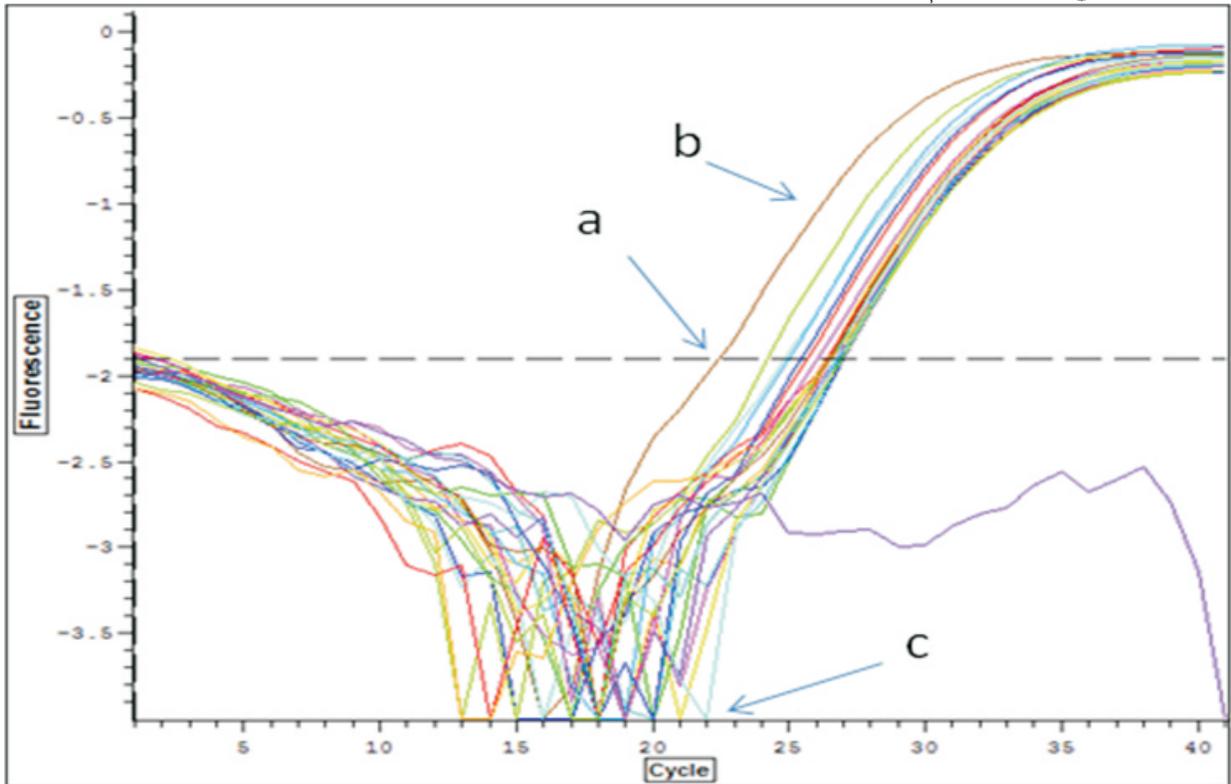


Figura 1. Ciclo umbral de la reacción, **a**: proyección del ciclo umbral, **b**: primer paciente en registrar incremento de fluorescencia, **c**: ciclo en el que no se inicia fluorescencia.

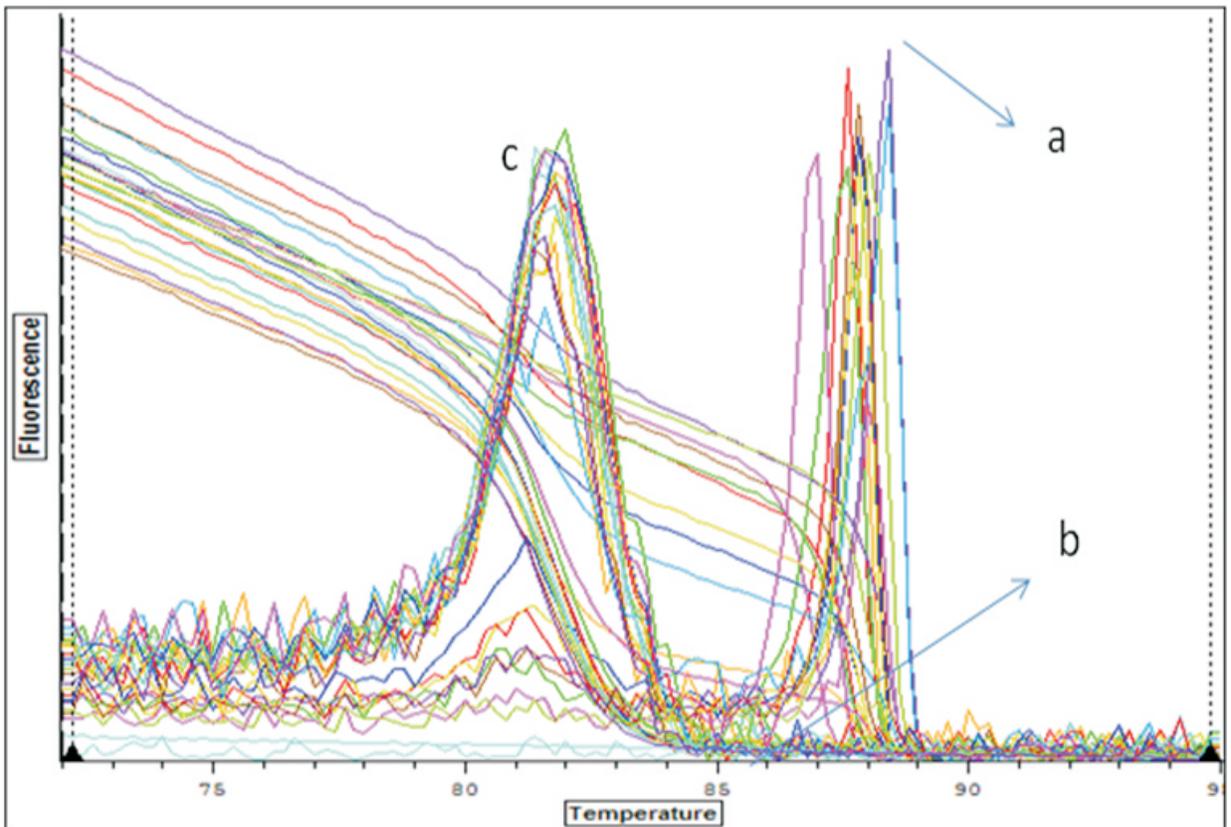


Figura 2: Curva de fusión (curva *melting*): **a**: primer paciente en alcanzar la T_m más alta, **b**: temperatura de fusión de la prueba, **c**: pacientes de T_m inferiores a 85.

ser una técnica de resultados precisos, reproducibles y sensibles. Si bien la tecnología implementada en este trabajo es de gran aplicabilidad y actualmente es considerada como de primera elección para la cuantificación de ácidos nucleicos, con gran aplicabilidad en el diagnóstico clínico y seguimiento de enfermedades infecciosas, su utilización debe hacerse con extremo cuidado siguiendo protocolos ampliamente comprobados a nivel mundial que permitan una interpretación fidedigna de los resultados obtenidos (10). Su implementación en nuestro medio representa un gran avance en lo que al conocimiento en el área de diagnóstico molecular se refiere, poniéndonos a la par de laboratorios clínicos y de investigación a nivel mundial, lo que contribuye además a la implementación de herramientas de punta en el diagnóstico virológico.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado a través del proyecto CDCHT-ULA-M-937-07-07-F.

Correspondencia: Dra. Lisbeth Berrueta, Instituto de Inmunología Clínica, Edificio Louis Pasteur, Anexo al IAHULA, Av. 16 de Septiembre, Mérida, Venezuela. e-mail: lberruet@ula.ve

Referencias

1. Vermehren, J., Kau, A., Gärtner, B. C., et al. 2008. Differences between two real-time PCR based hepatitis C virus (HCV) assays (RealTime HCV and Cobas

AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for RNA detection and quantification. *J. Clin. Microbiol.* 46:3880-3891.

2. Dehesa-Violantea, M., Nunez-Naterasb, R. 2007. Epidemiology of hepatitis virus B and C. *Arch. Med. Res.* 38:606-611.

3. Scott, J. D., Gretch, D. R. 2007. Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection. *JAMA* 297:724-732.

4. Seidl, S., Kühnl, P., Beyer, J., et al. 1990. Hepatitis C virus (HCV) antibodies in German blood donors--a pilot study. *Beitr. Infusionsther* 26:18-21.

5. Montes, H., Berrueta, L., Cova, J., et al. 1995. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C en pacientes multitransfundidos. *Gen* 49:132-139.

6. Blitz-Dorfman, L., Monsalve, F., Porto, L., et al. 1994. Epidemiology of hepatitis C virus in western Venezuela: lack of specific antibody in Indian communities. *J. Med. Virol.* 43:287-290.

7. Esteban, J. I., Esteban, R., Viladomiu, L., et al. 1989. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 2:294-297.

8. Cova, J., Rangel, A., Montes, H., Hernández, M. 1996. Anticuerpos anti-VHC en insuficientes renales crónicos. *Gen* 50:16-21.

9. Mimms, L., Vallari, D., Ducharme, L., et al. 1990. Specificity of anti-HCV ELISA assessed by reactivity to three immunodominant HCV regions. *Lancet* 336:1590-1591.

10. Chevaliez, S., Bouvier-Alias, M., Brillet, R., Pawlotsky, J.M. 2007. Overestimation and underestimation of hepatitis C virus RNA levels in a widely used real-time polymerase chain reaction-based method. *Hepatology* 46:22-31.

11. Watzinger, F., Ebner, K., Lion, T. 2006. Detection and monitoring of virus infections by real time PCR. *Mol. Asp. Med.* 27:254-298.

12. Rehermann, B., Nascimbeni, M. 2005. Immunology of hepatitis B and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 5:215-229.

13. Daniel, H. D., Grant, P. R., Garson, J. A., et al. 2008. Quantitation of hepatitis C virus using an in-house real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in plasma samples. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 61:415-420.