

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL: UN ENSAYO ESENCIAL PARA LA DEFINICIÓN Y EL MANEJO DE LA HEPATITIS CRÓNICA B

Dres. Fortes María del Pilar *, Toro Félix I. **, Vargas Berta *, Vivas Carlos *, V. Machado Irma*.

*Intediag-HV, Integración Diagnóstica en Hepatitis Viral, Caracas

**Asesor Externo, Intediag-HV

RESUMEN

Introducción: la gran demanda de un método confiable, reproducible, específico y altamente sensible para la cuantificación de ácidos nucleicos (ADN/ARN), marcó el desarrollo de los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (RCPc) en tiempo real. **Objetivo:** descripción y análisis de la RCPc en tiempo real para la definición y el manejo actual de los pacientes con hepatitis crónica B (HCB). **Material y Método:** fueron investigadas cuarenta muestras de suero provenientes de portadores conocidos del VHB empleando RCPc tiempo real mediante el sistema Rotor-Gene 3000 [Corbett Research, Sydney, Australia]. **Resultados:** el sistema utilizado para RCPc tiempo real detecta secuencias de ADN VHB en un amplio rango que puede ser expresado tanto en copias/ml como en IU/ml. Su aplicación permite la clasificación final de los diferentes portadores del VHB, ilustrándose su utilidad en el seguimiento secuencial de aquellos pacientes con HCB en tratamiento. **Conclusión:** la detección y la medición de secuencias de ADN VHB, en muestras clínicas de suero mediante RCPc en tiempo real, aporta mayor sensibilidad y precisión para definir la historia natural y el estado de replicación viral de los portadores crónicos del VHB antes, durante y posterior al tratamiento.

Palabras clave: Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa Tiempo Real, ADN VHB, Hepatitis Crónica B.

SUMMARY

Introduction: The great need of a reliable, reproducible, specific and highly sensitive method to detect nucleic acids (DNA/RNA), induced the development of real-time quantitative assays based on polymerase chain reaction (real time PCRq). **Objective:** Description and analysis of a real time PCRq assay for the definition and management of patients with chronic hepatitis B (CHB). **Material and Method:** Forty serum samples from known HBV carriers were investigated employing real-time PCRq by means of a Rotor-Gene 3000 system [Corbett Research, Sydney, Australia]. **Results:** the system for real-time PCRq detects a wide range of HBV DNA sequences which could be expressed either in copies/mL or in IU/mL. Its application allows the final classification of different HBV carrier status. An illustration of its usefulness in the sequential follow-up of patients on treatment for CHB is made. **Conclusion:** the detection and measure of HBV DNA sequences in clinical serum samples through real-time PCRq is more sensitive and exact to define the natural history and the status of viral replication in HBV chronic carriers before, during and after treatment.

Key words: Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction, HBV DNA, Chronic Hepatitis B

INTRODUCCIÓN

El creciente desarrollo tecnológico molecular ha permitido el surgimiento de la Medicina Molecular, en la cual el diagnóstico y el seguimiento del paciente es complementado, y eventualmente modificado, dependiendo de los resultados obtenidos con estas tecnologías. Sus aplicaciones son muy amplias e incluyen procedimientos diseñados para cuantificar la regulación y la expresión de marcadores de resistencia a drogas en células tumorales, monitorear la respuesta a la quimioterapia, medir la bio-distribución y la transcripción de genes así como su regulación en la respuesta a fármacos utilizados en terapia génica, detectar células tumorales circulantes en pacientes con cáncer y, finalmente, la detección y cuantificación de patógenos, sean éstos bacterianos o virales⁽¹⁾.

La gran demanda de un método confiable, reproducible, específico y altamente sensible para la detección de ácidos nucleicos (ADN/ARN), marcó el desarrollo de los ensayos cuantitativos mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCPc) en tiempo real^(1,2). En esta metodología, la generación del elemento amplificado (amplicón) se puede observar mientras el proceso de amplificación progresa "en tiempo real", ya que la fluorescencia generada en cada ciclo de amplificación es detectada por el sistema óptico del equipo especialmente diseñado para este propósito^(1,3). La cantidad de fluorescencia detectada en cada ciclo va a ser proporcional a la cantidad del producto de amplificación generado⁽³⁾.

En el caso de la cuantificación de las secuencias del virus de la hepatitis B (ADN VHB) el método se basa en la amplificación de regiones específicas del genoma del VHB, detectando el producto amplificado mediante fluorescencia. Esto se logra empleando una sustancia capaz de generar fluorescencia, la cual se incorpora a la molécula de ADN que se sintetiza^(2,3).

La presente comunicación tiene como objetivo describir brevemente la tecnología RCPc en tiempo real discutiendo su valor actual en la definición y en el manejo de los pacientes infectados en forma crónica por el VHB.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL. Se utilizan muestras de suero obtenidas de sangre total, cumpliendo las normas usuales de asepsia y las pautas de rigor para la separación y el almacenaje de alícuotas, para ser evaluadas únicamente mediante investigaciones moleculares. Para este análisis se seleccionaron 40 muestras de suero de portadores del VHB conocidos: 17 provenientes de portadores del VHB clasificados en estado inactivo de la infección; 19 muestras de pacientes con diagnóstico de hepatitis crónica B (HCB) antígeno e positivo (VHB tipo salvaje) y 4 pacientes con HCB antígeno e negativo (mutante del gen core: core del VHB).

METODO. Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa (RCPc) en tiempo real para ADN VHB. El ADN de la muestra se extrae de 200 L de suero usando el QIAamp DNA mini-estuche (Qiagen, Hilden; Alemania) de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. El ADN es eludido en 40 L de agua libre de nucleasas, de los cuales, 20 L son añadidos a 30 L de la mezcla de reacción para RCP. La reacción es llevada a cabo usando una mezcla comercial que contiene secuencias específicas para la amplificación de la región de 134 bases pares del genoma del VHB más el fluoróforo SYBR-Green (Qiagen, Hilden; Alemania). El proceso de amplificación de las secuencias de ADN viral es llevado a cabo en un equipo Rotor-Gene 3000 (Corbett-Research, Sydney, Australia) registrándose la fluorescencia del producto amplificado a través del canal Cycling A.FAM. Además, el estuche contiene un segundo sistema de amplificación

para identificar posible inhibición de la RCP, el cual es detectado como un control interno en el canal de fluorescencia Cycling A.JOE. Las condiciones de la reacción son incubación a una temperatura de 95°C, por 10 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos y 72°C por 15 segundos.

La cuantificación del número exacto de moléculas de ADN VHB, presentes en una muestra determinada, se hace mediante una curva de calibración que se construye a partir de 5 estándares de concentración conocida que van desde 10 UI/ μ l a 100.000 UI/ μ l confirmados mediante la comparación con un estándar establecido por la Organización Mundial de la Salud^(4,5).

RESULTADOS

La figura 1 representa los resultados obtenidos en las 40 muestras clínicas seleccionadas. Dado el amplio rango de secuencias que pueden detectarse entre un paciente y otro, el número de copias/ml de ADN VHB se expresa para esta ilustración como la media + la desviación estándar de los Log₁₀ copias/ml. Como se puede observar, los portadores de antígeno e superficie del VHB (Ag_sH_B) clasificados como inactivos demuestran un número de copias menor al portador activo, ya sea este antígeno e positivo o antígeno e negativo. Si la media la expresamos en número de copias/ml, los portadores inactivos demuestran un promedio de 631 copias/ml (rangos de 40 a 6.800); los portadores activos con HCB antígeno e positivo un promedio de 10.000.000 de copias/ml (rangos de 125.000 a 965.000.000) y los portadores activos con HCB antígeno e negativo, una media de 1.584.893 copias/ml (rangos de 48.000 a 10.243.000).

En la figura 2 se aprecia una curva de RCPc en tiempo real para la cuantificación de secuencias de ADN VHB en un paciente con HCB antígeno e negativo, antes y después del tratamiento. Antes del tratamiento se detectaron 6.286.400 copias/ml de ADN VHB. Luego de la terapia el número de copias fue indetectable (<20 copias/ml). Este resultado indica que ha ocurrido supresión viral post-tratamiento, es decir, respuesta terapéutica virológica.

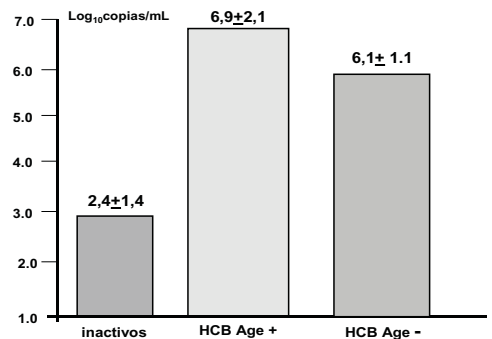


Figura 1. Resultados de RCPc en tiempo real para ADN VHB circulante (carga viral) expresados en media + desviación estándar de Log₁₀ copias/ml. Portadores inactivos = 17; HCB Age+ (Antígeno e positivo) = 19 HCB Age- (Antígeno e negativo) = 4

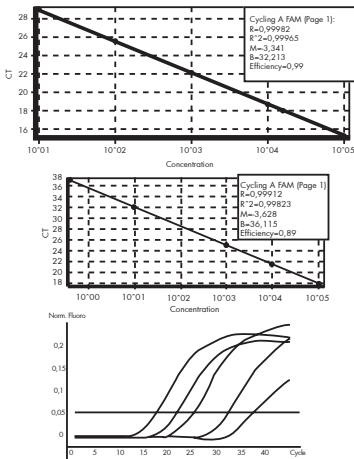


Figura 2. Curva de RCPc en tiempo real para la cuantificación de secuencias de ADN VHB en una paciente con HCB antígeno e negativo antes y después del tratamiento.

La curva de color magenta corresponde a la paciente y las curvas de color azul corresponden a los estándares. El valor o número de ciclos en el cual la muestra alcanza el umbral de detección de fluorescencia (Ct) es llevado a la curva de calibración construida con los estándares y de esta manera se hace la cuantificación. Antes del tratamiento este punto corresponde a 15.716 UI/μl (6.286.400 copias/ml). Después del tratamiento el ADN VHB es indetectable (<20 copias/ml).

DISCUSIÓN

La utilización de la cuantificación de las secuencias de ARN VHC mediante ensayos cuantitativos tipo RCP, incluyendo RCPc en tiempo real, forma parte del esquema de seguimiento del paciente crónicamente infectado con el virus de hepatitis C desde hace más de 3 años⁸. Durante el año 2001 y luego en los años 2003 y 2005, se realizaron a nivel mundial diferentes discusiones y consensos sobre la hepatitis B, en las que se consideró la cuantificación de ADN VHB circulante (carga viral) dentro de las diferentes características que definen al estado de portador crónico de AgsHB [7-9]. De esta forma, la carga viral establece el estado activo o el estado inactivo de la infección en cuanto a la replicación del virus, característica que en conjunto con otros criterios (clínicos, bioquímicos, serológicos e histopatológicos) diferencia al portador que sólo mantiene exceso de envoltura viral circulante (inactivo= AgsHB+, ADN VHB <100.000 copias/ml, ALT normal) del portador que se encuentra replicando al virus completo (activo= AgsHB+, ADN VHB >100.000 copias/ml)^[7,9].

La diferenciación de abordaje terapéutico, tanto en el enfermo con HCB antígeno e positivo como en el paciente con HCB antígeno e negativo, requiere de la cuantificación de ADN VHB^[7,11].

En general, los algoritmos que tratan de facilitar la decisión de administrar terapia para el control de la carga y replicación viral establecen que en HCB antígeno e positivo una carga viral, mayor o igual a 100.000 copias/ml, indica "actividad" del VHB tipo salvaje. Para los pacientes con HCB antígeno e negativo (mutante del gen precore: core) algunos autores reducen el límite a 10.000 copias/ml basados en el hecho probado que esta última HCB puede progresar más rápidamente y responde menos a la terapia actual¹⁰. Aun cuando estos dinteles de ADN VHB circulante se consideran arbitrarios, es im-

portante destacar que con el empleo de la RCPc en tiempo real constatamos que efectivamente el paciente con HCB antígeno e negativo mantiene cargas virales circulantes menores que las cuantificadas en el portador del VHB tipo salvaje (antígeno e positivo), hecho este que ya ha sido documentado^[12] pero que refuerza la selección de un límite menor de carga viral (>10.000 copias/ml) para la decisión de tratamiento en estos pacientes^[10]. Por otra parte, confirmamos que el portador de AgsHB "inactivo", anteriormente clasificado como "no virémico"^[13,14] puede demostrar intermitentemente carga viral, mientras que el portador activo o "virémico" puede presentar cargas virales en rango variable y de millones a millardos de copias/ml.

No obstante, ya la Organización Mundial de la Salud ha tratado de uniformizar la expresión de la cuantificación de ADN VHB en UI/ml^[4,5] como ya lo hizo para el ARN VHC. Hasta el presente, los consensos sobre hepatitis B continúan recomendando la expresión en copias/ml y, en general, toda la instrumentación y equipos empleados actualmente en los diferentes países desarrollados para la medición de carga viral del VHB lo expresan o lo transforman a copias/ml. El uso de log₁₀ copias/ml es requerido para la variación durante y post-terapia, sobre todo si se van a seguir las pautas que tratan de facilitar el seguimiento de estos pacientes^[9,10]. En el ejemplo que ilustramos la paciente disminuyó 6,8 log₁₀ copias/ml luego de la terapia antiviral, lo que indica en este caso que la paciente tuvo buena respuesta virológica [9,10].

En conclusión, la detección y la medición de secuencias de ADN VHB en muestras clínicas tipo suero mediante RCPc en tiempo real aporta mayor sensibilidad y precisión para definir la historia natural y el estado de replicación viral de los portadores crónicos del VHB antes, durante y posterior al tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Der Velden, Hochhaus A, Cazzaniga G et al. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 2003; 17: 1013-34.
2. Pawlowsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002; 122:1554-68.
3. Stelzl E, Muller Z, Marth E, Kessler HH. Rapid Quantification of HBV DNA by automated simple preparation and real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6):2445-2449.
4. Bowden DS, Locarnini SA. How virology can help the diagnosis of hepatitis B. *Hepatology* Rev 2004; 1:13-22.
5. Saldanha J, Gerlich W, Lelie N et al. An international collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis B virus DNA nucleic acid amplification techniques. *Hov Sang* 2001; 80:63-71.
6. Machado IV, León RV, Golindano C y col. Genotipos y cuantificación de ARN VHC en el abordaje clínico y terapéutico de la hepatitis crónica por virus C en Venezuela. *Gen* 2003; 57:E.40-E.44.
7. Lok AS, Heathcote EJ, Hoofnagle JH. Management of Hepatitis B 2000, Summary of a Workshop. *Gastroenterology* 2001; 120:1828-53.
8. EASL Jury. EASL International consensus conference on hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 38:533-40.
9. Liaw YF, Leung N, Guan R et al. Asian Pacific Consensus Statement on the management of chronic hepatitis B: a 2005 update. *Liver International* 2005; 25:472-89.
10. Keeffe EB, Dieterich DT, Han SH et al. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:839-848.
11. Lok ASF, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 2003; 39:857-881.
12. Chu CJ, Hussain M, Lok ASF. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology* 2002; 36:1408-15.
13. Zaboleta M, Toro F, Ruiz ME, Colmenares C, Bianco NE, Machado IV. Assessment of Former and Newly Developed HBV Assays in a Third World Setting. *J Med Virol* 1992; 38:240-245.
14. Machado IV, Deibis L, Riskey E et al. Abordaje inmunoclinico, molecular e inmunopatológico de la hepatitis crónica viral. *Gen* 1994; 48:124-132.

Para cualquier información o separata contactar a:

Dra. Machado Irma. Intediag-HV, Integración Diagnóstica en Hepatitis Viral, Caracas.

Correo-e: intediag@cantv.net.

Fecha de Recepción Sep. 2006. Fecha de Revisión Jun 2007. Fecha de Aprobación Ago. 2007.