

III. Aplicación de nuevas técnicas de biología molecular a la virología. Detección de tamizaje en bancos de sangre

Del Rey-Pineda G.*

Historia

La Biología Molecular ha avanzado desde finales de 1860 en que Miescher aisló una nucleoproteína que finalmente fue un ácido nucleico, el cual en la década de 1940 Avery y sus colaboradores demostraron que contenía la información genética en la bacteria *Pneumococcus*. En la década de 1950 Watson y Crick en base a los estudios de cristalografía de rayos X de Franklin, identificaron la estructura de doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN). El posterior entendimiento de la replicación del DNA junto con el descubrimiento de Kornberg en la década de 1950, de la DNA polimerasa capaz de sintetizar fragmentos de DNA. Fueron la base de los desarrollos tecnológicos que derribaron el dogma genético DNA RNA Proteína, al descubrirse en 1970 por Temin la transcriptasa reversa, encontrada en algunos virus RNA (llamados retrovirus) que permite al RNA ser copiado a DNA. Las enzimas denominadas endonucleasas de restricción, junto con todo el arsenal de la década de 1980, permitió a Mullis amplificar segmentos con la reacción de polimerasa en cadena (PCR), método que pronto se convirtió en "un procedimiento de rutina" en los laboratorios de Biología Molecular. En un corto período esta tecnología ha modificado radicalmente el diagnóstico clínico.

Necesidad de técnicas más sensibles en la detección de virus en productos sanguíneos

Para que un Banco de Sangre sirva a su propósito real, que es proporcionar productos sanguíneos útiles con el mínimo riesgo de infectar a los receptores sanguíneos, los exámenes practicados a cada uno de los donadores deben ser correctos y las determinaciones de cada uno de los donadores deben ser relevantes para el diagnóstico y vigilancia de los mismos, cuando hay evidencias de infección, fundamentalmente para no transmitir los agentes causales de enfermedades infecciosas como son el Virus de la Hepatitis B (VHB), Virus de la Hepatitis C (VHC) y Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).

El principal problema que se tiene en el escrutinio de los donadores es que el tamizaje de agentes etiológicos se realiza mediante la huella inmunológica detectando IgG,

por el método de ELISA enzimático, o por inmunoensayo QUIMIOLUMINISCENCIA, por lo que el periodo de ventana serológico es aproximadamente de 16 días después de la infección para el caso de VIH-1, de 70 días para VHC, y para VHB es de 45 días.¹

Técnicas de biología molecular en el escrutinio de la serología viral en bancos de sangre

La implementación de metodologías de Biología Molecular como la tecnología de ácidos nucleicos (NAT), en el escrutinio de donadores, fue posible sólo por la automatización y la adaptación de la metodología a grandes cargas de trabajo, como lo es el caso de la tecnología de Amplificación mediada por Transcripción (TMA), que utiliza un aparato TECAN que puede hacer hasta 16 mezclas o pools de muestras individuales, lo cual se valorará en el Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional "La Raza".

En principio, utilizar dicha metodología NAT reduce el riesgo residual de infecciones virales transmitidas por transfusión. Aún más, se están usando minipools de donadores unido a la tecnología NAT detectando VHC ó HIV y VHC,^{2,3} ó VIH, VHC y VHB.⁴

La metodología NAT ha demostrado en algunos casos ser eficiente para mejorar la transfusión segura comparado con el tamizaje basado sólo en la detección de anticuerpos,⁵⁻⁷ sin embargo la metodología NAT no puede detectar todas las infecciones en período de ventana, porque se han reportado casos en los cuales componentes sanguíneos que fueron NAT negativo causaron hepatitis postransfusión.⁸⁻¹⁰ No obstante, la introducción de la metodología NAT para tamizaje de la sangre, reduce la incidencia de la hepatitis postransfusión.^{11,12}

Lo anterior se debe a que las metodologías basadas en detección de anticuerpos son capaces de detectar la infección vírica durante la fase crónica solamente,¹³ por lo que es necesario conocer la inmunobiología de la infección para interpretar adecuadamente los resultados brindados por las técnicas NAT, y darles su justo valor. De esta manera es imprescindible contar con ambas metodologías para disminuir la probabilidad de no detectar productos sanguíneos infectantes. Por ejemplo se ha

* Banco Central de Sangre CMN "La Raza" Banco Central de Sangre. Centro Médico Nacional Siglo XXI. IMSS. México, D.F.

demostrado utilizando paneles de seroconversión de donadores de plasma que después del contacto infectante con el VHB, hay un período de 2 a 4 semanas antes de que se pueda detectar el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) durante el cual, el ADN VHB puede ser detectado por pruebas NAT.

El sistema de minipool y la automatización de NAT en el banco de sangre

El advenimiento de la tecnología de microchips hizo posible inventar aparatos que pudieran automatizar las técnicas NAT, y particularmente que fueran de alto rendimiento al realizar mezclas o pools de los plasmas o sueros de los donadores, y aún más, determinar en un mismo tubo de reacción los dos virus RNA que son VHC y HIV y el DNA que es el VHB.

En el Banco de Sangre del CMN “La Raza” se evalúa uno de esos aparatos, con su metodología, que utiliza como mezclador el TECAN y la metodología NAT la denominada PROCLEIX ULTRIO ASSAY que es una técnica basada en la amplificación mediada por transcripción.

El sistema Procleix Ultrio creado por Chiron y Gen-Probe aparentemente disminuye la ventana serológica entre la infección y la detección amplificando y detectando secuencias virales.¹⁶ Se ha reportado que reduce la detección de la ventana arriba de 50% para VIH, de 22 días a aproximadamente 11 días,^{14,17} y cerca de 72 días para VHC, de 82 días a aproximadamente 23 días.¹⁵ Para VHB es detectado un promedio de 20 días más temprano que las pruebas serológicas.¹⁸

Sin embargo existe evidencia de que la metodología puede no ser tan sensible como se piensa. Varía su sensibilidad de acuerdo a la seroprevalencia, llegando a detectar de 10 a 20 copias, pero debe ser probada en las poblaciones en las cuales se utilizará para dar su valor real a esa población. Se ha reportado que el grado de detección depende del número de copias virales en el paciente, en el caso de VIH < 400 copias/mL pueden no ser detectadas en minipools de 8 muestras, o aun procesándola como muestra única, por lo que se define que ambas metodologías, la serológica y la NAT son imprescindibles y no mutuamente excluyentes.

En el Banco de Sangre del CMN “La Raza” del IMSS, se evalúa dicha metodología, estableciendo un planteamiento en el cual la determinación de la serología de VIH y VHC se realiza por quimioluminiscencia usando un aparato PRISMA, al igual que la determinación de HBsAg. Lo cual determina períodos de ventana para hepatitis B de 45 días, hepatitis C de 70 días y VIH de 16 días, los cuales se verán reducidos con el estudio adicional de la prueba TMA, en minipools de 16 plasmas.

El objetivo genérico del estudio es el determinar la sensibilidad de TMA simultánea para la detección de hepatitis B, hepatitis C y VIH en minipools de 16 muestras en donadores, contrastando con la quimioluminiscencia y la determinación individual.

La técnica en su proceso genérico se muestra en el cuadro I.

El principio de la metodología TMA Procleix es la siguiente:

- Captura Selectiva .
- Captura los ácidos nucleicos virales en micropartículas magnéticas.
- Amplificación Mediada por Transcripción (TMA).
- Amplifica porciones de RNA y/o DNA.
- Detección.

Ensayo de protección de la hibridación (HPA) inactiva selectivamente el marcaje AE (éster de acridinio) sobre las sondas no hibridadas para reducir al máximo el ruido de fondo.

La tecnología de ensayo cinético dual (DKA) simultáneamente detecta el control (IC), la carga viral de RNA o la señal de DNA.

La evaluación contempla trabajar con 6 000 muestras en 375 pools de 16 muestras cada uno, y 2000 procesadas individualmente para la determinación simultánea de VIH, VHB y VHC.

Los resultados preliminares hasta el momento son de 5264 donadores en 329 pools, (Cuadro II).

| Cuadro II. | | |
|-----------------|----------------------------|-------------------------------|
| Pools positivos | Discriminatorios positivos | Quimioluminiscencia positivos |
| 11 | 11 | 11 |

| Cuadro I. | | | | |
|--------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Hacer minipools de 16 muestras | Procesamiento muestras en pool o individual | Reacción TMA en baños de agua | Detección en baño de agua | Leer resultados en el luminómetro |

Cuadro III.

| Pruebas discriminatorias | Procleix TMA | Quimioluminiscencia |
|--------------------------|--------------|---------------------|
| VHC | 8 | 8 |
| VIH | 2 | 2 |
| VHB | 1 | 1 |

Hasta el momento la positividad de los pooles y las pruebas discriminatorias han coincidido, no hay resultados falsos positivos. Los ensayos discriminatorios diferencian la positividad, porque en el pool positivo no se sabe que ácido nucleico fue detectado, y las pruebas discriminatorias emplean sondas específicas para VIH, VHC ó HB.

Pruebas Discriminatorias de los 11 pooles positivos, cuadro III.

Actualmente con estos resultados preliminares existe coincidencia entre la prueba serológica de quimioluminiscencia y TMA discriminatorio.

Hasta el momento la metodología Procleix en las aproximadamente 6 corridas, ha invalidado 1. Todo coincide con los resultados de otros investigadores que han encontrado discordancias entre NAT y serología. Con estos resultados podemos concluir preliminarmente que aparentemente no hay problemas de resultados falsos positivos, por lo que la especificidad será como se ha referido por el fabricante del 100%. Las discrepancias que pudieran existir y que se han encontrado en otros estudios deben de interpretarse en función del ciclo de infección del agente determinado, por lo que la sensibilidad analítica del ensayo Procleix Ultrio es alta, pero se determinará con el estudio del panel de seroconversión que podrá demostrar que achica la ventana de detección, lo cual será crítico para el análisis de la sensibilidad en pooles de 16 muestras.

Referencias

- Jackson BR, Busch MPñ, Stramer SL, AuBuchon JP.** The costeffectiveness of NAT for HIV, HCV and HBV in whole-blood donations. *Transfusion* 2003; 43:721-729.
- Busch MP, Kleinman SH, Jackson B, et al.** Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion* 2000;40:143-59.
- Glynn SA, Kleinman SH, Wrigh DJ, Busch MP.** International application of the incidence rate/window period model. *Tranfusion* 2002;42:966-72.
- Jos JAM, Weusten Harry AJ, van Drimmelen P, Nico L.** Mathematic modeling of the risk of HBV, HVC, and HIV transmission by window-phase donations not detected by NAT. *Transfusion* 2002;42:537-48.
- Roth Wk, Weber M, Buhr S, et al.** Yield of HCV and HIV-1 NAT after screening of 3.6 million blood donations in central Europe. *Transfusion* 2002;42:862-8.
- Dodd RY, Notari EP 4th, Stramer SL.** Current prevalence and incidence of infectious diseases markers and esstimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion* 2002;42:975-9.
- Gallarda JL, Dragon E.** Blood screenin by nucleic acid amplification technology:Current issues, future challenges. *Molecular Diagnosis* 2000;5:11-22.
- Schüttler CG, Caspari G, Jursch CA, et al.** Hepatitis C virus transmission by blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA(letter). *Lancet* 2000;355:41-2.
- Matsumoto C, Tadokoro K, Fujimura K, et al.** Analysis of HBV infection after blood transfusion e Japan through investigation of comprehensive donor specimen repository. *Transfusion* 2001;41:878-84.
- Weusten JJ, Drimmelen HA, Lelie PN.** Mathematic modeling of the risk of HBV, HVC, and HIV transmission by window-phase donations not detected by NAT. *Transfusion* 2002; 42:537-48.
- Mitsunaga S, Fujimura K, Matsumoto C, et al.** High-throughput HBV DNA and HCV RNA detection system using a nucleic acid purification robot and real-time detection PCR: its to analysys of posttransfusion hepatitis. *Transfusion* 2002;42:100-5.
- Seed CR, Cheng A, Ismay SL, et al.** Assessing the accuracy of three viral risk models in predicting the outcome of implementing HIV and HCV NAT donor screening en Australia and the implications for future HBV NAT. *Transfusion* 2002;42:1365-72.
- Ling AE, Robbins KE, Brown TM, et al.** Failure of routine HIV-1 tests in a case involving transmission with preseroconversion blood components during the infeccious window period. *JAMA* 2000;284:210-4.
- Busch MP, Stramer SL, Kleinman SH.** 1997. Evolving applications of nucleic acid amplification assays for prevention of virus transmission by blood components and derivatives. In: Garrity G (ed): *Applications of Molecular Biology to Blood Transfusion Medicine*. AABB. Bethesda, MD. 123-176.
- Schreiber GB, et al.** 1996. *For the Retrovirus Epidemiology Study*.
- Kolk D, Martínez A, Ahern S, Binder A, Knight J, Tidd J, Sun G, Coffman B, Eaton B, McElroy A, Park M, Linnen J, Dockter J, McDonough S, Mimms LT, Giachetti C, Macioszek J.** Simultaneous NAT screening of HIV-1, HCV and HBV in blood donations on a fully automated, high throughput system. *Abstract Transfusion* 2002;42,9S:82S-83S.
- Aprili G, Gandini G, Piccoli P, et al.** Detection of an early HIV-1 infection by HIV RNA testing in an Italian blood donor during the preseroconversion window period. *Transfusion* 2003;43:848-52.
- Linnen JM, Broulik A, Umali A, Kolk D, Dockter J, McDonough S, Mimms L, Giachetti C.** Analytical Sensitivity of the PROCLEIX™ ULTRIO™ ASSAY (A TMA-based triplex assay) for simultaneous screening of HIV-1, HCV and HBV in blood donations and effect of assay sensitivity on closing the HBV detection window. *Abstract Transfusión* 2002;42:9S:8S.