

González González, Yaime J.¹
García de la Rosa, Iria¹
García Ferrera, Waldo Orlando²

Diagnóstico serológico de la infección por el virus c de la hepatitis (parte I)

Hepatitis c virus infection, serological diagnosis (part I)

Fecha de aceptación: octubre 2020

Resumen

Las pruebas serológicas se han convertido en herramientas fundamentales en el diagnóstico y manejo de la infección por el virus de la hepatitis c (VHC). Estas pruebas incluyen la detección de anticuerpos contra el VHC en suero, la detección y cuantificación del ARN-VHC, así como la determinación del genotipo del VHC en suero. Estas pruebas son fundamentales en el diagnóstico y manejo terapéutico de la hepatitis c. En este artículo hacemos una revisión exhaustiva del tema.

Palabras clave: *virus de la hepatitis c, pruebas serológicas, virológicas, ARN del VHC.*

Abstract

Serological examinations have become essential tools in the diagnosis and management of infection with the hepatitis c virus (HCV). These tests include detection of antibodies to HCV in serum, detection and quantification of HCV-RNA, as well as determination of the genotype of HCV in serum. These tests are essential in the diagnosis and therapeutic management of hepatitis c. In this article we make an exhaustive review of the subject.

Keywords: *hepatitis c virus, serological, virological tests, HCV RNA.*

Introducción

Durante las últimas décadas, el desarrollo progresivo de nuevas herramientas para el diagnóstico viral ha hecho posible que las diferentes entidades se puedan descubrir y estudiar no sólo en los laboratorios especializados, sino también en laboratorios de rutina. Las pruebas diagnósticas simples, rápidas y económicas para la detección de antígenos han reemplazado las técnicas tradicionales, largas y muy costosas, lo cual ha permitido mayor agilidad en la definición del diagnóstico.¹

Como podemos apreciar, en la fase de infección aguda se elevan abruptamente la viremia y las alanino aminotransferasas (ALT), mientras que los anticuerpos demoran varias semanas en aparecer, en promedio de siete a ocho semanas después del comienzo de la infección,^{2,4} primero se eleva la IGM, la cual sólo está presente en la fase aguda, lo que sirve como marcador específico de esta etapa. Al final aparece la IGG, en promedio a las 11 semanas en pacientes inmunocompetentes, pero en enfermos hemodializados o profundamente inmunodeprimidos, como los trasplantados, puede demorar aún más con bajos títulos e incluso no dar reactivos.

La respuesta anti-VHC persiste indefinidamente en pacientes que desarrollan infecciones crónicas, aunque es posible que estos anticuerpos no se lleguen a detectar con los ensayos actuales en pacientes con hemodiálisis o en casos de profunda inmunodepresión. Una seroconversión aparente puede ocurrir en esos pacientes inmunodeprimidos, en quienes la naturaleza crónica de la infección se confirma mediante la persistencia del ARN del VHC.⁵

En la fase de infección crónica la viremia no es tan elevada, produce oscilaciones que pueden llegar a alcanzar valores tan bajos del ARN viral que no sean detectables. Es importante tener en cuenta este comportamiento al estudiar individuos en la etapa de cronicidad.

En esta fase los títulos de anticuerpos IGM son muy bajos o no detectables, y sirven como marcador pro-

¹ Laboratorio de Biología Molecular, Centro Nacional de Inmunoensayo, La Habana, Cuba

² Departamento de Gastroenterología, Sección de Hepatología, Hospital Universitario Calixto García, La Habana, Cuba.

Correspondencia: Dr. Waldo Orlando García Ferrera
Calle 17 núm. 907, entre B y C C.P. 10400, Vedado, La Habana, Cuba.

Dirección electrónica: garciaferrera63@gmail.com

nóstico de la respuesta antiviral. Por el contrario, los títulos de anticuerpos IgG son muy elevados a lo largo de toda la enfermedad, llegando a detectarse aun después de cinco años de recuperado el paciente.

De acuerdo con este análisis podemos realizar el diagnóstico virológico y el seguimiento de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) utilizando dos tipos de ensayos de laboratorio: las pruebas indirectas y las directas.⁶

Las pruebas indirectas son ensayos serológicos que detectan anticuerpos específicos sintetizados por el huésped frente a antígenos constitutivos del VHC o ante proteínas producidas en su proceso de replicación. Su positividad indica que el paciente estuvo o está infectado con el virus, pero de ninguna manera confirma una infección activa por VHC.

Las directas son ensayos que pueden detectar, cuantificar y caracterizar los componentes de la partícula viral del VHC, como el ARN viral y el antígeno del núcleo (antígeno core) y, por tanto, su positividad es expresión de la presencia del virus y de infección activa.⁵ Estas pruebas juegan un papel muy importante en el diagnóstico de la infección, en la toma de decisiones terapéuticas y además ofrecen valor predictivo de la respuesta virológica a la terapia.

Este trabajo brinda un compendio sobre las diferentes pruebas de mayor aplicabilidad en el diagnóstico de la hepatitis por virus C.

Cuadro 1.
Métodos diagnósticos del VHC

| |
|---|
| A. Métodos de detección de anticuerpos: |
| 1. Pesquisajes: EIA, ELISA de detección de anticuerpos 2. Confirmatorios: RIBA (opcional) 3. Detección de anticuerpos de tipo IgM |
| B. Métodos de detección de antígenos: |
| 1. Antígeno core VHC-EIA |
| C. Métodos moleculares de determinación del ARN: |
| 1. Cualitativo o de detección del ARN viral 2. Cuantificación de la carga viral |
| D. Métodos de determinación del genotipo: |
| 1. Genotipaje molecular 2. Serotipaje |

Métodos de detección de anticuerpos contra el virus C de la hepatitis

Hasta ahora ha sido imposible el cultivo del virus de la hepatitis C y, por ende, la obtención de antígenos naturales. No obstante, el conocimiento de las secuencias nucleotídica y aminoacídica del VHC han hecho posible obtener proteínas recombinantes y péptidos sintéticos, los cuales han permitido el desarrollo de los ensayos de detección de anticuerpos, que son los recomendados para realizar el pesquisaje primario.⁷ Además, se recomienda que éste se haga sólo a los grupos de riesgo, pues el estudio de la población en general tiene un bajo costo-eficacia.⁸

Existe un gran número de pruebas disponibles para la detección de anticuerpos contra el VHC: las pruebas serológicas de primera línea (EIA o ELISA) y las pruebas complementarias o confirmatorias de anticuerpos (RIBA).

Las técnicas inmunoenzimáticas son ampliamente usadas para detectar y, en ocasiones, para cuantificar antígenos virales o anticuerpos en los fluidos corporales.⁵

Las más utilizadas son los ensayos inmunoenzimáticos (EIA) y los enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA), el cual es un tipo específico de EIA. Éstos son ensayos de bajo costo, rápidos y fáciles de realizar, actualmente están parcial o totalmente automatizados y permiten estudiar un gran número de muestras.

En los EIA y los ELISA los anticuerpos del suero o plasma o los antígenos virales son capturados en pozos de microplacas por los antígenos correspondientes o los anticuerpos específicos (en general monoclonales), respectivamente, los cuales están unidos a la fase sólida. El complejo antígeno-anticuerpo se revela por una reacción enzimática colorimétrica o fluorimétrica, la cual se lee en un espectrofotómetro o fluorímetro. La relación entre la densidad óptica o la fluorescencia de la muestra y los controles del ensayo permite obtener el resultado final.⁹

Método ELISA para determinación de anticuerpos: UMELISA® HCV 3ª Generación

A través de las distintas generaciones de estos ensayos se ha ido incrementando la especificidad y, sobre todo, la sensibilidad de los mismos, desde entre 75 y 85% en la primera generación, hasta casi 100% en la cuarta.

Genoma y generaciones de pruebas de anticuerpos

Los primeros ensayos estaban plagados de falsos positivos y tenían periodos muy largos de "ventana serológica" (tiempo que media entre la infección por VHC y la seroconversión), lo que hacía que no se detectaran muchas personas infectadas, además tuvieron baja representación antigénica (muy pocas proteínas virales) y a las pruebas se le escapaban seropositivos.

Cuadro 2.
Periodos de ventana según las diferentes pruebas

| | |
|-------------------------|-----------|
| Anti-VHC 1ª generación | 150 días |
| Anti-VHC 2ª generación | 81.9 días |
| Anti-VHC 3ª generación | 63.8 días |
| Antígeno core VHC (EIA) | 14 días |
| ARN del VHC por PCR | 12.6 días |

El periodo de ventana serológica varía de un paciente a otro,⁵ la respuesta anti-VHC es detectable alrededor del comienzo de los síntomas clínicos en entre 50 a 70% de los pacientes y más adelante en el resto de los enfermos.¹⁰

Actualmente la detección de anticuerpos anti-VHC se realiza mediante ensayos inmunoenzimáticos de segunda o tercera generación.

El primer ensayo comercial desarrollado, conocido como prueba de primera generación, empleó una técnica de EIA que detectaba la presencia de anticuerpos contra la proteína c100-3 del VHC (anti-VHC). El antígeno c100-3 es una proteína no estructural, codificada por parte de la región NS4 del genoma viral. Esta prueba consistía en un EIA de captura de anticuerpo, en cuya fase sólida estaba unido el polipéptido c100-3, obtenido en levaduras como una proteína de fusión con la enzima superóxido dismutasa (SOD). Estas pruebas de primera generación (EIA-1) presentaban problemas de especificidad y sensibilidad, ya que sólo detectaban anticuerpos entre 75 y 85% de los pacientes infectados por el VHC.⁸

Debido a esto, se desarrollaron ensayos de segunda generación que incluían, además del péptido c100-3, otros dos péptidos: c22-3 (que corresponde a la nucleocápside viral) y el c33-c (que forma parte de la región NS3). Con este ensayo se mejoró ligeramente la especificidad de la prueba y se logró aumentar de manera notable la sensibilidad (93% de los pacientes infectados con el VHC). Además, con la inclusión de un péptido de la nucleocápside viral se pudo acortar el periodo de ventana para la detección de la seroconversión a anti-VHC tras la infección, ya que pasó de 16 semanas con EIA-1 a 10 semanas con EIA-2.¹¹

En la cuadro 3 se muestran las diferencias entre generaciones de EIA en cuanto a sensibilidad y valor predictivo positivo en poblaciones de bajo y alto riesgo.

Cuadro 3.
Comparación entre generaciones de EIA

| Ensayo | Sensibilidad (%) | Valor predictivo positivo en población de bajo riesgo/prevalencia de infección (%) | Valor predictivo positivo en población de alto riesgo/prevalencia de infección (%) |
|--------|------------------|--|--|
| EIA 1 | 70-80 | 30-50 | 70-85 |
| EIA 2 | 92-95 | 50-61 | 88-90 |
| EIA 3 | 97 | 75 | 90-95 |
| EIA 4 | 98.8-100 | - | - |

Posteriormente se desarrollaron las pruebas de tercera generación, en las que se utilizaron antígenos de las regiones core y NS3 reconfigurados y un antígeno recombinante adicional derivado de la región NS5.¹¹ Con las pruebas de tercera generación se ha conseguido aumentar la sensibilidad de la técnica EIA hasta en 97% y la especificidad es mayor de 99%.¹² Además se ha reducido el "periodo de ventana", pues se logró detectar el anti-VHC de siete a nueve semanas después de la infección.

Las pruebas de cuarta generación no están tan disponibles en el mercado porque todavía están surgiendo, y tienen como característica esencial que detectan anticuerpos dirigidos contra antígenos muy específicos de los diferentes genotipos del virus, sobre todo 1, 2 y 3.¹³⁻¹⁵

Pruebas confirmatorias de detección de los anticuerpos

Como consecuencia de los problemas de especificidad que presentaban los EIA de primera y segunda generación (resultados falsos positivos), se desarrollaron métodos confirmatorios conocidos como recombinant immunoblot assay (RIBA)¹⁶⁻¹⁸ o line immunoblot assay (LIA),¹⁹ dependiendo del fabricante de la prueba. Estas pruebas sólo detectan anticuerpos específicos a proteínas separadas o unidades del antígeno viral recubierto sobre tiras de nitrocelulosa en lugar de microplacas. En ellas se incorpora una proteína fusionada con los antígenos víricos (SOD en el caso del RIBA y estreptavidina en el caso del LIA). La reacción positiva se caracteriza por la aparición de bandas coloreadas en posiciones específicas en la tira. La interpretación puede ser visual o automática.

Se han desarrollado RIBA y LIA de primera, segunda y tercera generación. El RIBA de tercera generación incluye antígenos recombinantes de las regiones NS3 y NS5, y péptidos sintéticos derivados de las regiones core y NS4. El LIA de tercera generación incluye un antígeno recombinante de la región NS3 del VHC y péptidos sintéticos de las regiones core, E2, NS4 y NS5.

En estas pruebas confirmatorias un resultado se considera negativo cuando no aparece reactividad para ninguno de los antígenos víricos, indeterminado cuando solamente hay reacción frente a uno de los antígenos víricos o cuando hay reactividad para más de uno de estos antígenos, pero también para SOD o estreptavidina. Se considera que la prueba es positiva cuando hay reactividad para dos o más antígenos víricos sin que la haya para SOD o estreptavidina.

En resumen, las pruebas confirmatorias no son más sensibles que las pruebas de EIA, pero sí más específicas, por lo que se utilizan para distinguir falsos positivos de la prueba de EIA en personas que nunca estuvieron infectadas con el VHC.

Anticuerpos contra el VHC del tipo IGM

Tanto los sistemas diagnósticos como los comprobatorios para detectar anti-VHC presentan la limitación de que la aparición de anticuerpos de tipo IGG contra el VHC puede tardarse hasta un año después de la infección.^{2,4} Además, los títulos de anti-VHC de tipo IGG no se correlacionan con el curso de la enfermedad, de ahí su escasa importancia como marcador pronóstico. En cambio, el anti-VHC de tipo IGM aparece antes que el anticuerpo de tipo IGG y tiene utilidad en la diferenciación de hepatitis aguda y crónica.^{19,20}

Se ha detectado respuesta de tipo IGM contra los antígenos core, NS3 y NS4, que habitualmente coincide en el tiempo con la respuesta de tipo IGG. La respuesta más intensa de IGM está dirigida contra el antígeno del core, y en algunos casos es el primer marcador que aparece tras la infección por el virus.²¹

Debido a esto se han desarrollado métodos para detectar anti-VHC de tipo IGM frente al core de VHC. Es conocido que los títulos de anticuerpos anti-VHC de tipo IGM, durante la fase aguda de la infección, se correlacionan con la evolución a la cronicidad. La determinación de este marcador durante la fase crónica de la enfermedad puede servir como factor predictivo de respuesta al tratamiento antiviral. Aquellos pacientes con respuesta bioquímica completa al tratamiento con interferón, al inicio de la terapia presen-

tan niveles de anti-VHC IgM superiores a los no respondedores, y su desaparición durante el tratamiento se correlaciona con una respuesta viral sostenida.

No obstante, algunos autores plantean que, aunque la duración de la respuesta de IgM habitualmente es breve, con frecuencia se sigue detectando en la fase crónica de la enfermedad, por lo que no se ha demostrado que la determinación de IgM anti-VHC en el diagnóstico de la infección aporte datos claros y concluyentes sobre la biología o estadio de la infección viral.^{21,22}

Antígeno core del virus c de la hepatitis

La cápside icosaédrica del VHC está formada por la polimerización de la proteína core (21 kDa). Se ha demostrado que los niveles del antígeno del núcleo se correlacionan con los niveles de ARN viral.²³ Durante la seroconversión el antígeno core es detectado de uno a dos días después que el ARN-VHC con los métodos disponibles.^{24,25} De ahí que la cinética del core fluya en paralelo con la cinética del ARN-VHC. Se ha estimado que un picogramo de antígeno core total por mililitro es equivalente a aproximadamente 8 000 UI de ARN-VHC.²³ Esto permite que el título de antígeno core se use como un marcador de la replicación del VHC.^{5,26}

En el caso de la infección crónica por VHC, el número de partículas víricas en suero es muy bajo, esto hace que sea más difícil la detección de antígenos víricos mediante las técnicas convencionales.

La determinación y cuantificación del antígeno core total se puede realizar mediante un EIA (Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, Nueva Jersey, Estados Unidos). La versión actual del ensayo no detecta antígeno del núcleo cuando los niveles de ARN-VHC se encuentran por debajo de 20 000 UI/mL, lo cual limita su uso en el escenario clínico.²³

Otro método que permite detectar el antígeno del core del VHC en suero consiste en un EIA cuya fase sólida se encuentra recubierta con un anticuerpo monoclonal dirigido contra 35 aminoácidos de la proteína de la nucleocápside. Esta técnica tiene poca aplicación práctica debido a que necesita gran cantidad de suero del paciente (30 mL).

Los antígenos virales también se pueden detectar en biopsias hepáticas mediante técnicas de inmunohistoquímica. Con este fin se han utilizado anticuerpos mono y policlonales contra distintas proteínas del VHC. La determinación de los antígenos del VHC en las células hepáticas es un método de indudable valor diagnóstico, sin embargo, el hecho de que la técnica no esté estandarizada y que no exista un anticuerpo disponible comercialmente que proporcione resultados fiables, hace que no se pueda aplicar de forma rutinaria y sólo se ha reservado para trabajos de investigación.

Métodos moleculares para la determinación del ARN del VHC

Las técnicas de biología molecular son útiles para detectar y cuantificar el genoma viral en fluidos corporales mediante diferentes métodos.⁵

La secuencia genómica viral se puede analizar por genotipaje y, más frecuentemente, por medio de la secuenciación directa o por hibridación reversa.

Un aspecto muy importante que determina la calidad del diagnóstico molecular es la obtención y conservación de las muestras.

Características de la muestra para diagnóstico molecular

Mientras en los ELISA el suero o plasma puede conservarse algunos días a 4 °C y se detectan los anti-VHC si están presentes, para la detección o cuantificación del ARN viral es necesario tomar una serie de precauciones, pues el ARN es muy lábil y en condiciones inadecuadas se puede degradar y obtener un falso negativo debido a la mala conservación de la muestra.

Para estos ensayos se utilizan más comúnmente las muestras de suero o plasma humano, obtenido este último con los anticoagulantes ACD o EDTA en baja concentración (el EDTA es un agente quelante del magnesio, cofactor de la enzima Taq polimerasa y, por tanto, si está en alta concentración disminuye la eficiencia de polimerización de la enzima).

Las muestras tratadas con heparina no son útiles para esta prueba porque este anticoagulante inhibe la PCR.²⁷

La sangre con o sin anticoagulante, si va a ser transportada, se debe enviar al laboratorio a una temperatura de entre 2 y 25 °C y centrifugarse en las primeras cuatro horas luego de su recolección, durante 20 minutos de 800 a 1 600 g, para separar el suero o plasma de las células. El suero o plasma se transportará a una temperatura de 2 a 8 °C o congelado, y podrá ser conservado: de 2 a 8 °C un día como máximo, a -20 °C durante un mes y a -70 °C por un tiempo más prolongado.²⁸

Se recomienda no hacer congelaciones y descongelaciones repetidas de los sueros o plasmas porque se podrían producir falsos negativos de la prueba, sobre todo para muestras con baja viremia.

Entre las técnicas de diagnóstico molecular existen diferentes clasificaciones:²⁹

- Técnicas cualitativas (detección o no del ácido nucleico) y cuantitativas (determinación de la carga viral)
- Técnicas de no amplificación (hibridación clásica) o amplificación (PCR, NASBA)
- Técnicas de amplificación: de "la diana" (PCR, NAS-BA, TMA) o de la señal (ADN ramificado/Branched-DNA)

En las técnicas cualitativas o cuantitativas se utilizan indistintamente métodos de amplificación de "la diana" o de la señal, así como métodos donde no se amplifica porque la concentración del ácido nucleico en el fluido que se está estudiando es elevada y con una simple hibridación es suficiente para detectarlo o cuantificarlo.

El ARN del VHC está presente en cantidades muy bajas en el suero y los tejidos como para poder ser detectado por los métodos de hibridación clásica, como los que se utilizan para la detección del ADN del virus B de la hepatitis. Por ello es necesaria una etapa previa de amplificación.

Las técnicas de amplificación pueden ser de dos tipos dependiendo de la entidad que se amplifique: puede ser "la diana" (segmento de ADN o ARN a detectar) o la señal final:

Técnicas de amplificación de la diana

Su principio se basa en la síntesis, durante una reacción enzimática cíclica, de un gran número de copias del ácido nucleico (amplicones) que pueden detectarse por las técnicas habituales y/o se puede cuantificar la cantidad de genoma viral de la muestra

Se han desarrollado varias técnicas de amplificación del genoma viral:

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)³⁰ permite sintetizar copias del ADN vírico por medio de enzimas termoestables, como el ADN polimerasa Taq (*Thermus aquaticus*) mediante ciclos repetidos de desnaturalización del ADN, unión de dos cebadores específicos a la secuencia de interés y polimerización de la cadena de ADN. Se produce así un aumento exponencial en la cantidad de producto (amplicon). Una vez amplificadas las copias del ADN, se pueden detectar fácilmente mediante cualquier otro ensayo tradicional

Se han desarrollado técnicas basadas en la PCR:

- RT-PCR: proceso de amplificación de ARN (ribosomal, mensajero, genómico viral) que lleva un paso inicial de transcripción reversa para obtener un ADN copia que sirva de molde para la amplificación
- PCR anidada o nested PCR: los productos de una primera ronda de amplificación son nuevamente amplificados con un segundo juego de cebadores, lo cual eleva la especificidad del método (utiliza cuatro cebadores específicos) y reduce las amplificaciones secundarias aumentando también la sensibilidad del ensayo
- PCR múltiple: se puede amplificar con dos o más juegos de cebadores para detectar diferentes ADN dianas a la vez
- PCR inversa: amplifica fragmentos desconocidos de ADN que están flanqueados por secuencias conocidas³¹

En el caso del ARN del VHC hay estuches comerciales que utilizan dos de las técnicas descritas anteriormente para su detección, debido a su baja concentración en el suero o plasma.

Primero se realiza una RT-PCR (transcripción reversa) inicial con el objetivo de sintetizar un ADN copia (ADNC) o complementario al ARN viral para usarlo como molde en la reacción de PCR. Dependiendo de la buena sensibilidad de los cebadores utilizados, puede ser suficiente con este paso de amplificación, y en otros es necesario hacer una PCR anidada.

Luego se procede a realizar una PCR anidada con el objetivo de aumentar la sensibilidad o detectabilidad del ensayo.

Un esquema general del ensayo de detección del ARN del VHC es el que se aplica en el ensayo UMELOSA® HCV cualitativo.³¹⁻³⁴

Esquema general del ensayo: UMELOSA® HCV cualitativo

Desde el desarrollo en 1983 de la PCR por Kary Mullis³⁰ (lo cual le valió el Premio Nobel de Química, 1993), la técnica se venía realizando según protocolos puestos a punto por cada laboratorio. Se efectuaron estudios que demostraron que existían diferencias notables en cuanto a la sensibilidad,

especificidad y reproducibilidad del ensayo, pues todo el proceso se realizaba manualmente en tres baños térmicos a diferentes temperaturas y después de cada paso de desnaturalización era necesario añadir la enzima, pues no era estable a más de 40 °C, esto era un proceso muy largo, laborioso y con alto riesgo de contaminación muestra a muestra. El descubrimiento en el Parque Nacional de Yellowstone (Estados Unidos) del *Thermus aquaticus*³⁵ y la obtención de su ADN polimerasa resistente a altas temperaturas, y el desarrollo por la Perkin Elmer de un equipo denominado thermocycler, o secuenciador térmico, han permitido realizar esta técnica con más confiabilidad.

Ventajas de la PCR:

- Alta sensibilidad y especificidad, independiente de la respuesta inmune y del desarrollo de la enfermedad.
- Versatilidad: debido a su alta especificidad, cada segmento de ADN o ARN genómico es blanco potencial para un ensayo diagnóstico por PCR
- Detecta el ADN proviral latente
- Los resultados se obtienen con rapidez
- Requiere de poca muestra de suero o plasma, la cual se inactiva al comenzar el proceso
- Es aplicable a una amplia variedad de muestras clínicas, forenses, etc
- Permite detectar en diferentes tejidos la replicación extrahepática
- Detecta el genoma viral en las muestras durante el periodo de ventana (de 8 a 12 semanas) y en los hemoderivados
- Permite determinar la carga viral
- Permite realizar la caracterización molecular de los virus (genotipaje)
- Es útil para el seguimiento de los esquemas terapéuticos y estudios de resistencia a antivirales
- Permite el diagnóstico en personas inmunodeprimidas, con deficiencia renal crónica o trasplante de órgano
- Se emplea en los procedimientos de clonaje y expresión de proteínas virales
- No sólo se utiliza para la detección del blanco en suero o plasma, también se aplica para estudiar la presencia del genoma viral en el tejido hepático y en células mononucleares de sangre periférica

Limitaciones de la PCR

Falsos negativos:

- Recolección inapropiada de la muestra
- Muy baja carga viral, inferior al límite de detección de la técnica
- Secuencia del patógeno alterada
- Presencia de inhibidores que reduzcan la eficiencia de la reacción

Falsos positivos:

- Por contaminación cruzada entre muestras y por arrastre de amplicones
- Similitud entre genes celulares y secuencias retrovirales
- Amplificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos (nucleic acid sequence-based amplification,

nas-ba).³⁶ Esta técnica permite obtener copias del arn viral en forma de arn de simple cadena complementaria al arn genómico mediante una reacción enzimática cíclica con tres enzimas diferentes

Ventajas:

- Estabiliza e inactiva el arn viral para su transportación
- Utiliza todo tipo de muestras y volúmenes: plasma, suero, sangre seca y sangre total, leche, semen, saliva, linfocitos y tejidos
- Notable control de la contaminación
- Amplificación isotérmica
- Amplificación selectiva de arn en presencia de adn
- Elevada robustez por el uso de tres calibradores
- Cuantificación reproducible

Limitaciones:

- Mucha manipulación en la detección
- Necesidad de un equipo específico de electroquimioluminiscencia (ECL)
- Costo elevado

La amplificación mediada por transcripción (transcription-mediated amplification, TMA)³⁷ consiste en una reacción isotérmica y usa dos enzimas: la reverso transcriptasa y la arn polimerasa T7. El amplicon también consiste en una cadena simple de arn.

La ventaja de las técnicas de amplificación de la diana, como las descritas, es su gran sensibilidad. Los inconvenientes son una cierta falta de reproducibilidad en los casos de bajos niveles de viremia y la posibilidad de aparición de falsos positivos. En general éstos se deben a la contaminación con productos amplificados en reacciones precedentes.

DetECCIÓN POR HIBRIDACIÓN REVERSA

La detección de los amplicones obtenidos por PCR y TMA se realiza mediante un ensayo de hibridación en condiciones de astringencia fuertes con sondas de oligonucleótidos fijados a una fase sólida. Las sondas son diseñadas por complementariedad con las diferentes secuencias amplificadas. La unión amplicon-híbrido se revela en una reacción

enzimática, seguida por la detección de color o de señal luminiscente o fluorescente. La hibridación a una sonda en particular significa que el fragmento analizado tiene una secuencia complementaria.³⁸

TÉCNICAS DE AMPLIFICACIÓN DE LA SEÑAL

Los métodos clásicos de hibridación permiten acoplar, gracias a una sonda nucleotídica, una molécula señal (molécula radioactiva o enzima) a cada molécula de genoma viral. Sin embargo, la baja tasa de replicación del vhc da lugar a una baja concentración de partículas virales circulantes, haciendo que la señal emitida sea indetectable por las técnicas convencionales de hibridación molecular. Los métodos de amplificación de la señal se basan en la fijación de un gran número de moléculas señal a cada molécula de arn, permitiendo así la detección de estos híbridos.

El único método comercial disponible hoy en día, basado en esta técnica, es el adn ramificado (branched dna).³⁹ El genoma viral primero hibrida con sondas unidas a la fase sólida y con otras sondas que lo unen a una molécula de adn ramificado, la cual a su vez se une a cientos de sondas de adn conjugados con enzima. La detección se basa en la emisión luminiscente del sustrato hidrolizado por la enzima. La cuantificación se basa en la curva estándar generada simultáneamente usando estándares conocidos.

En un inicio esta técnica no presentaba muy buena sensibilidad y sólo se utilizaba para cuantificar, actualmente ya ha alcanzado valores de sensibilidad muy buenos tanto para la detección como para la cuantificación.⁴⁰

La limitación de esta técnica es que requiere de un luminómetro, pero las ventajas son su especificidad, su buena reproducibilidad, no requiere de equipos especiales para la amplificación y es un método muy rápido y sencillo.

Conflicto de intereses

Los autores de este manuscrito no tienen conflictos de intereses por revelar.

Fuentes de financiamiento

No hubo financiamiento de institución o empresa para este fin.

Referencias

1. Crespo, M.P. "El diagnóstico viral por el laboratorio", *Colombia Medica*, 2000, 31 (3).
2. Hino, K., Sainokami, S., Shimoda, K., Niwa, H. y Lino, S., "Clinical course of acute hepatitis c and changes in hcv markers", *Dig Dis Sci*, 1994, 39: 19-27.
3. Farci, P., Alter, H.J., Wong, D., Miller, R.H., Shih, J.W., Jett, B. y Purcell, R.H., "A long-term study of hepatitis c virus replication in non-A, non-B hepatitis", *N Engl J Med*, 1991, 325: 98-104.
4. Puoti, M., Zonaro, A., Ravaggi, A., Marin, M.G., Castelnovo, F. y Cariani, E., "Hepatitis c virus RNA and antibody response in the clinical course of acute hepatitis c virus infection", *Hepatology*, 1992, 16: 887-881.
5. Pawlotsky, J.M., "Use and interpretation of virological tests for hepatitis c", *Hepatology*, 2002, 36 (5): s65-s73.
6. Bukh, J., Miller, R.H. y Purcell, R.H., "Genetic heterogeneity of hepatitis c virus: quasiespecies and genotypes", *Semin Liver Dis*, 1995, 1 (15): 41-63.
7. Padrón, G.J., Arus, E., Morales, J., Muzio, V., Penton, E., Mas, P., Sariol, C.A. et al., *Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales*, La Habana, Elfos Scientiae, 1998, pp. 161-184.
8. Carey, W., "Tests and screening strategies for the diagnosis for hepatitis c", *Cleveland Clin J Medicine*, 2003, 70 (4): 7-13.
9. UMELISA® HCV 3ª Generación para la detección de anticuerpos al vhc en suero, plasma y sangre seca sobre papel de filtro, "Instructivo del ensayo", CIE, 2000.
10. National Institutes of Health (NIH), "Consensus and state of the science statements", *Statement on Management*

- of Hepatitis c, 2002, 19 (3).
11. Hoofnagle, J.H., "Course and outcome of hepatitis c", *Hepatology*, 2002, 36: 21-29.
 12. Colin, C., Lanoir, D., Touzet, S., Meyaud-Kraemer, L., Bailly, F. y Trepo, C., "Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis c virus antibody detection assays: an analysis of the literature", *J Viral Hepat*, 2001, 8: 87-95.
 13. ImmunoComb® II HCV kit: a rapid test for the qualitative detection of IgG antibodies to hepatitis c virus (HCV) in human serum or plasma, Code: 60455002, Organics.
 14. Bassit, L., Van Heuverswyn, H., De Bosschere, K., Nishiyama, A.S. *et al.*, Comparative study of two anti-HCV screening tests in a large genotyped population of Brazilian dialysis patients", *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2002, 21: 404-406.
 15. Maertens, G., Vorsters, A., Royens, B., Dekeyser, F. y Zrein, M., "A fourth generation assay for the screening of HCV antibodies", Hepatitis Program, Innogenetics NV, presentada en la European Association for the Study of the Liver, 34th Annual Meeting, Nápoles, Italia, 8-12 de abril de 1999.
 16. Skidmore, S., "Recombinant immunoblot assay for hepatitis c antibody", *The Lancet*, 1990, 335 (8701): 1346.
 17. Van der Poel, C.L., Cuypers, H.T.M., Reesink, H.W. *et al.*, "Confirmation of hepatitis c virus infection by new four-antigen recombinant immunoblot assay", *The Lancet*, 1991, 337 (8737): 317-319.
 18. Alter, H.J., Tegtmeier, G.E., Jett, B.W. *et al.*, "The use of a re-combinant immunoblot assay in the interpretation of anti-hepatitis c virus reactivity among prospectively followed patients, implicated donors, and random donors", *Transfusion*, 1991, 31 (8): 771-776.
 19. LIA TEK HCV III, Organon Teknika, B.V., Holanda.
 20. Ortiz-Ibarra, F.J., Figueroa-Damián, R., Lara-Sánchez, J., Arredondo-García, J.L. y Ahued-Ahued, J.R., "Prevalencia de marcadores serológicos de los virus de la hepatitis A, B, C y D en embarazadas", *Salud Pública Mex*, 1996, 38: 317-322.
 21. Picazo, J.J. y Fuertes, A., "Diagnóstico serológico de la hepatitis c", *Protocolos de Diagnóstico Serológico Clínico*, 5, DSC.
 22. Dutra Souto, F.J., Fernandes Fontes, J. y Coimbra Gaspar, A.M., "Prevalence of Hepatitis B and C virus markers among malaria-exposed gold miners in Brazilian Amazon", *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001, 96.
 23. Pawlotsky, J.M., Prescott, L., Simmonds, P., Pellet, C., Laurent-Puig, P., Labonne, C., Darthuy, F. *et al.*, "Serological determination of hepatitis c virus genotype: comparison with a standardized genotyping assay", *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1734-1739.
 24. Courouze, A.M., Le Marrec, N., Bouchardeau, F., Razer, A., Maniez, M., Laperche, S. y Simon, N., "Efficacy of HCV core antigen detection during the pre-seroconversion period", *Transfusion*, 2000, 40: 1198-1202.
 25. Lee, S.R., Peterson, J., Niven, P., Bahl, C., Page, E., DeLeys, R., Giordano-Schmidr, D. *et al.*, "Efficacy of a hepatitis c virus core antigen enzyme-linked immunosorbent assay for the identification of 'window-phase' blood donations", *Vox Sang*, 2001, 80: 19-23.
 26. Bouvier, A.M., Patel, K., Dahari, H., Beaucourt, S., Larderie, P., Blatt, L., Hezode, C. *et al.*, "Clinical utility of total hepatitis c virus (HCV) core antigen quantification, a new indirect marker of HCV replication", *Hepatology*, 2002, 36: 211-218.
 27. Miyachi, H. *et al.*, "Monitoring of inhibitors of enzymatic amplification in polymerase chain reaction and evaluation of efficacy of RNA extraction for the detection of hepatitis c virus using the internal control", *Clin Chem Lab Med*, 1998, 36 (8): 571-575.
 28. Busch, M.P., Wilber, J.C., Johnson, P., Tobler, L. y Evans, C.S., "Impact of specimen handling and storage on detection of hepatitis c virus RNA", *Transfusion*, 1992, 32: 420-425.
 29. Tang, Y.W., Procop, G.W. y Persing, D.H., "Molecular diagnosis of infectious diseases", *Clin Chemistry*, 1997, 43 (11): 2021-2038.
 30. González, Y.J., González, I., Vina, A., Armas, A., García, I. y Solís, R.L., "Desarrollo de un sistema de diagnóstico molecular para la detección cualitativa del ARN del virus de la hepatitis c", *Biotecnología Aplicada*, 2003, 20 (2): 122-125.
 31. González, I., Vina, A., Armas, A., García, I. y González, Y.J., "Design of an antisense RT-PCR primer efficient for all hepatitis c virus genotypes. Comparison of its performance vs. a commercial primer", *Analytical Biochemistry*, 2003, 315 (2): 281-284.
 32. González, I., González, Y.J., Armas, A., Vina, A. *et al.*, "Validation of a nested PCR assay UMELOSA® HCV Cualitativo for detection of hepatitis c virus", *Biologicals*, 2003, 31 (1): 55-61.
 33. González, I., González, Y.J., Vina, A., Armas, A. y Solís, R.L., "The usefulness of UMELOSA hepatitis c virus qualitative kit as supplemental test for confirmation of hepatitis c virus infection", *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2004, 37: 25-27.
 34. Mullis, K.B. y Faloona, F.A., "Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Methods Enzymol*, 1987, 155: 335-350.
 35. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S. *et al.*, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase", *Science*, 1988, 239: 487-491.
 36. Compton, J., "Nucleic acid sequence-based amplification", *Nature*, 1991, 350: 91-92.
 37. Guatelli, J.C., Whitefield, K.M., Chappelle, H.L., Di Michelle, L.J. *et al.*, "Isothermal *in vitro* amplification of nucleic acids by multi-enzyme reaction modeled after retroviral replication", *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1874-1878.
 38. Lok, A.S.F. y Gunaratnan, N.T., "Diagnosis of hepatitis c", *Hepatology*, 1997.
 39. Collins, M.L., Zayati, C., Detmer, J., Daly Kolberg, J., Chang, C., Irvine, I., Tucker, J. y Urdea, M.S., "Preparation and characterization of RNA standards for use in quantitative branched DNA hybridization assays", *Anal Biochem*, 1995, 226: 120-129.
 40. Collins, M.L., Irvine, I., Tyner, D., Fine, E., Zayati, C., Chang, C., Horn, T., Ahle, D., Detmer, J., Shen, L.P., Kolberg, J., Bushnell, S., Urdea, M.S. y Ho, D.D., "A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml", *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 2979-2984.