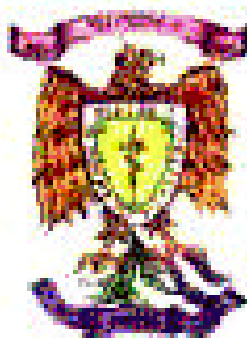


INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL



A Dios,
por permitirme el don de la vida
y bendecirme unos padres y una familia maravillosa.

A mis padres Edna y Antonio,
por su inmenso amor y
sus bendiciones que iluminan mi camino,
por consolarme en los momentos difíciles y
compartir siempre mis sueños,
por educarme con el ejemplo y
respaldar mi desarrollo profesional y personal,
por enseñarme a caminar
y hacer de mí la persona que soy,

A Irma, Silvia, Antonio y Martha, mis hermanos,
por su cariño, comprensión y entusiasmo,
por compartir mi sueño y
por su apoyo sin reservas para convertirlo en realidad.

AGRADECIMIENTOS.

A todos aquellos que colaboraron en la elaboración de esta tesis,
unos con cariño, paciencia, amistad, aliento o conocimiento,
otros quienes tuvieron la confianza de indicarme errores y desaciertos
que me permitieron disciplinarme,
ambos generaron mayor conocimiento, superación y experiencia
y la satisfacción de llegar a la meta propuesta.

Gracias a:

Dr. Guillermo Pérez Ishiwara, por creer en mí y brindarme la oportunidad de participar en este proyecto; por su confianza, apoyo, tiempo, dedicación y paciencia.

Químico Francisco Paz Bermúdez, por su eficiente apoyo técnico en la realización del trabajo experimental y por permitirme compartir sus conocimientos; por su apoyo incondicional, dedicación, paciencia, disponibilidad y amistad.

M. C. Guillermo Bojorquez Rangel, por sus consejos, comentarios, tiempo e infinita paciencia.

Dra. Consuelo Gómez García, por sus comentarios y valiosas sugerencias.

Dr. Juan Salas Benito, por permitirme trabajar en su laboratorio.

Dr. Joaquín Rodrigo García, por sus valiosos comentarios y sugerencias.

Químico Gerardo Juárez y al personal del Laboratorio Juárez en la Ciudad de Oaxaca, Oax., por el apoyo brindado para el corrimiento de la RT-PCR tiempo real, por su tiempo y por compartir su experiencia profesional.

Dr. Alejandro Martínez, por sus comentarios y apoyo.

Biólogo Héctor Esparza, por su interés y comprensión.

Pensiones Civiles del Estado de Chihuahua, Delegación Ciudad Juárez y al Dr. Manuel Ruiz Ramírez, Asesor Médico durante la realización de este trabajo, por el apoyo brindado para la realización de la primera parte de este trabajo; por sus comentarios, sugerencias y su amistad.

Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, en particular al Instituto de Ciencias Biomédicas y la Coordinación de Ciencias Básicas, por el interés puesto para que sus docentes se desarrollen profesionalmente para beneficio de los alumnos.

Personal del área de la Salud de Pensiones Juárez y la UMF No. 46 de IMSS por su interés y disposición para recolectar las muestras.

Personal del Laboratorio de Análisis Clínicos de Pensiones Juárez, a Susan, Rubén, Rosy, Pat, y Ricardo, sin su apoyo no podría haber salido adelante. Gracias.

A los Pacientes, que cada día depositan su salud y su confianza en mis manos, Inspiración y Motivación para convertir este proyecto en realidad.

A Paola, Jorge, Antonio, Alejandro y Andrés

Este trabajo fue realizado T Í T U L O.

Uso de la RT-PCR en tiempo real para la determinación cualitativa y cuantitativa del virus de Hepatitis C.

ÍNDICE

i.	ÍNDICE.....	7
ii.	RELACIÓN DE CUADROS, GRÁFICOS E ILUSTRACIONES.....	9
iii.	RESUMEN.....	11
iv.	ABSTRACT.....	13
v.	INTRODUCCIÓN.....	15
	1. Virus de la hepatitis C.....	15
	i. Características generales.....	15
	ii. Ciclo viral.....	16
	a) Adhesión.....	16
	b) Entrada.....	16
	c) Replicación.....	17
	d) Ensamblado.....	17
	e) Salida.....	18
	iii. Mecanismo de transmisión.....	19
	iv. Sintomatología.....	20
	v. Manifestaciones clínicas.....	22
	vi. Patología huésped/órgano.....	22
	vii. Diagnóstico.....	27
	a) Observación directa de síntomas clínicos.....	27
	b) Histológico.....	27
	c) Ensayos en muestras sanguíneas.....	27
	• Enzimas.....	27
	• Anticuerpos.....	28
	• RIBA.....	28
	• Moleculares.....	28
	viii. Tratamiento.....	30
	2. PCR en tiempo real.....	32
vi.	JUSTIFICACIÓN.....	42
vii.	HIPÓTESIS.....	44
viii.	OBJETIVOS.....	45
	a) General.....	45
	b) Particular.....	45
ix.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
	i. Muestra.....	46
	• Selección.....	46
	• Toma de muestras.....	47
	• Almacenamiento.....	48
	• Traslado.....	48
	ii. Estrategia experimental.....	48
	• Aislamiento de ARN.....	50
	• Análisis espectrofotométrico.....	53
	• Análisis electroforético.....	54
	• RT-PCR convencional.....	55
	• RT-PCR en tiempo real.....	56
x.	RESULTADOS.....	61
	i. Características clínicas de los pacientes.....	61
	ii. Detección de anticuerpos vs. VHC.....	63
	iii. Extracción de ARN de las muestras.....	64
	iv. Amplificación por RT-PCR convencional.....	65
	v. Amplificación por RT-PCR tiempo real.....	66
xi.	DISCUSIÓN.....	75

xii.	RECOMENDACIONES.....	78
xiii.	SUGERENCIAS.....	80
xiv.	GLOSARIO.....	82
xv.	BIBLIOGRAFÍA.....	84
xvi.	ANEXOS.....	88

RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURAS:

Número	Título	Página
1	Organización del genoma de VHC.....	11
2	Ciclo de vida de un flavivirus.....	13
3	Actividad química de una sonda fluorogénica. Representación de la polimerización durante la fase de extensión de la PCR en tiempo real.....	30
4	Comportamiento de la emisión de fluorescencia en la PCR en tiempo real.....	32
5	Cuantificación de productos por RT-PCR en tiempo real. Modelo de amplificación.....	33
6	Comportamientos de los fluoróforos en la PCR en tiempo real.....	36
7	Estrategia experimental.....	44
8	Resultados de la electroforesis en gel de agarosa después del proceso de extracción y purificación del ARN.....	59
9	Resultados de la electroforesis en gel de agarosa previa RT-PCR convencional.....	61
10	Grafica de la curva de calibración de Roto-Gene.....	62
11	Grafica de la curva de comportamiento de la emisión de fluorescencia en RT-PCR tiempo real.....	62
12	Diferencia de resultados entre RT-PCR convencional vs. RT-PCR en tiempo real.....	64

TABLAS:

Número	Título	Página
1	Patrón de temperaturas de la RT-PCR convencional.....	56
2	Patrón de temperaturas de la RT-PCR en tiempo real.....	56
3	Relación entre la vía de contagio y el genotipo viral.....	57
4	Tiempo transcurrido entre la sospecha de infección por Hepatitis viral y detección con Anticuerpos (+) y RT-PCR (+)	58
5	Efecto del Tratamiento con INF y ribavirina ARN viral.....	58
6	Resultados del rastreo de anticuerpos vs. VHC.....	59
7	Resultados RT-PCR tiempo real en ROTOR-GENE.....	63
8	Relación del tiempo de exposición con la aparición de ARN de VHC en suero.....	66
9	Diferencia observada según el método utilizado en el diagnóstico de VHC.	67
10	[ARN viral] en pacientes con Acs (-) y RT-PCR t.r. (+).....	68

RESUMEN

Los virus son los agentes causales de muchos padecimientos humanos y pueden causar enfermedades en diferentes órganos y tejidos del cuerpo; específicamente los que causan inflamación del hígado, mejor conocidos como virus de las hepatitis y que constituyen una familia con una gran variedad de tipos, cada uno con características propias como tamaño, estructura composición, genética y forma de replicación; entre estos virus están los tipos virales A, B, C, D, E y G.

Entre estos virus merece especial atención el virus de la hepatitis C (VHC). La infección con el virus de la hepatitis C, a diferencia de los otros tipos virales, causa un número excepcionalmente alto de casos con enfermedad hepática crónica. La infección con VHC con frecuencia no produce síntomas por un período de tiempo relativamente largo, por esta razón, la mayoría de los pacientes no son conocedores de su infección. Se sabe que la terapia es más efectiva en los estadios tempranos de la enfermedad y el único tratamiento probado y efectivo, a la fecha, es el interferón alfa en combinación con la Ribavirina. Sin embargo, no todos los pacientes con hepatitis C crónica responden a la terapia, bajo estas circunstancias, el tratamiento además de costoso para el paciente, puede causar serios efectos secundarios como el debilitamiento del sistema inmune.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha permitido la detección ácidos nucleicos a partir de sólo una copia de una secuencia particular, que puede ser específicamente amplificada y detectada guardando una relación cuantitativa entre la cantidad inicial de secuencia blanco y la cantidad del producto por PCR. Aunado a lo anterior, los avances tecnológicos y la incorporación de un sistema de detección de productos de PCR conforme estos se acumulan, resulta en lo que se conoce como *PCR en tiempo real*; el cual presenta características que lo hacen un método único: la inclusión de sondas fluorogénicas, un ciclador térmico, una fuente de luz ultravioleta y un detector de la fluorescencia, controlados por una computadora; eliminan la variabilidad tradicionalmente asociada con la PCR cuantitativa, permitiendo la cuantificación de productos de PCR de forma de precisa y confiable.

Los resultados obtenidos con las diferentes metodologías utilizadas verifican mi hipótesis y observaciones. En relación al rastreo de anticuerpos específicos contra VHC encontramos

que sólo 20 de las 132 muestras procesadas fueron positivas. Por la RT-PCR convencional sólo se procesaron las muestras positivas por anticuerpos, para verificar que el método de extracción fuera exitoso y se encontró que las 20 muestras positivas para anticuerpos fueron también positivas por RT-PCR convencional. El valor de la carga viral determinada por RT-PCR convencional se conocía, razón por la cual no fue mi propósito procesar estas muestras para cuantificación. Los resultados obtenidos de la RT-PCR tiempo real fueron por demás interesantes, se detectaron muestras con genomas virales en las cuales el huésped todavía no formaba anticuerpos, y nosotros encontramos 17 muestras negativas para la búsqueda de anticuerpos y genomas virales positivos por RT-PCR tiempo real., lo que significa que con esta metodología, parte central de este trabajo, tenemos la oportunidad de detectar la infección causada por el VHC antes de la formación de anticuerpos, lo cual disminuye considerablemente el período de ventana. Esta metodología, al mismo tiempo nos provee la oportunidad de controlar la replicación viral durante los estadios tempranos de la infección y controlar y/o disminuir los danos principalmente a los hepatocitos y otros orórganos de los individuos infectados. Otra ventaja es que podemos detectar y medir a la vez la carga viral, sin el riesgo de contaminación por manejo posterior de los replicados como sería en el caso de utilizar la RT-PCR convencional, lo cual disminuye tiempos de proceso y riesgo de contaminación por manejo de muestra.

A B S T R A C T

Viruses are the cause of human sufferings and they may cause diseases in different organs and body tissues, specifically those that cause liver inflammation, best known as hepatitis viruses, and constitute a group with a variety of types each one with its own characteristics as size, structure, composition, genetics and replication mode; among this viruses are the viral type: A, B, C, D, E and G.

Hepatitis C Viruses (HCV), among viral type viruses, requires special attention. Different from other viral type infections caused by the hepatitis C virus causes a great number of chronic liver diseases. Patients with HCV infection frequently do not have any symptoms for a relatively long term, for this reason, the majority of patients is not aware of the infection. In the other hand, therapy is more effective during the first stages of the disease, and up to this date the only tried and effective treatment is alpha-Interferon combined with Ribavirina. However, not all patients with chronic hepatitis C respond to such therapy, under those circumstances, treatment, besides expensive for the patient, may cause secondary side effects as debilitation of immune system.

The PCR or Polymerase Chain Reaction (PCR) has permitted detection of nucleic acids from a single copy of a particular sequence; this can be specifically amplified and detected with a quantitative relationship between the starting target amount sequence and the amount of the PCR product. Moreover, technological advances and incorporation of PCR products detection system while those are accumulate, results in Real Time PCR, which one has characteristics that make it a unique method: fluorogenic probes inclusion, a thermal cycler, ultraviolet light and a fluorescent detector controlled by computer, eliminate the variability traditionally associated with quantitative PCR, thus allowing the precise and reliable quantification of PCR products.

Results of different methodologies used confirm my hypothesis and observations. Regarding to searching of specific antibodies against HCV, it was found that only 20 of the 132 processed samples were positive. Positive samples for antibodies were the only processed by the conventional RT-PCR to verify that the extraction method was successful and was found out that the 20 positive samples for antibodies were also positive for conventional RT-PCR. The value of the viral load determined by conventional RT-PCR was known, for that

reason it not was my purpose to process those samples for quantification. The results obtained from the Real Time RT-PCR were quite interesting, samples with viral genomes were detected where the host hasn't formed any antibodies, and we find 17 samples with trace of negative antibodies and viral genomes positives by RT-PCR real time, which means that with this methodology, material part of this work, we have the opportunity to detect infection caused by HCV before the formation of antibodies, which diminish considerably the window period. This methodology, at the same time provides us the opportunity to control the viral replication during early stages of the infection and to control and/or diminish damages mainly to hepatocytes and other organs of the infected individuals. Other advantage is the simultaneous detection and measurement of the viral load with out any contamination risk for the posterior handling of the replications, as in the event of a conventional RT-PCR method, which reduces the process time and contamination risk for sample handling.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis C es actualmente la más común de las infecciones crónicas transmitidas por la sangre y la causa principal de hepatitis postransfusión (Murray, 1997). Desafortunadamente la infección por VHC es un problema mayor, 200 millones de personas están infectadas alrededor del mundo y según datos oficiales de salud pública, estos números están creciendo. Actualmente cerca de 4.5 millones de personas están infectadas solo en USA. Este virus no fué identificado hasta 1989 (Dartmouth College, 1998) y se estima que cerca del 90% de los casos de hepatitis se deben a VHC (Murray, 1997). La hepatitis C es un proceso infeccioso de origen viral, que produce inflamación del hígado y conlleva a menudo a cirrosis hepática y ocasionalmente progresa a carcinoma hepatocelular (Lagging y col, 1998). En México se estima que un millón de personas están infectadas con el virus de la hepatitis C y la mayoría de ellas no han sido diagnosticadas. Se dice que hay más infectados con el virus de la Hepatitis C que con el virus causante de la inmunodeficiencia adquirida (Lowen, 1999).

VIRUS DE LA HEPATITIS “C”.

CARACTERISTICAS GENERALES.

El virus causante de la hepatitis C, se clasifica dentro de los virus RNA clase I. Pertenece a la familia de los flavivirus*, posee un ARN lineal, de una sola cadena, no segmentado y en sentido positivo** (Schaechter y col., 1998). Es un virus icosaédrico, con envoltura que presenta un diámetro de 80 nm***. Como se muestra en la Fig. 1, el tamaño de su genoma es de 9.5 kilobases, donde se incluye un marco de lectura abierta de 9030-9099 nucleótidos, entre regiones altamente conservadas que no codifican localizadas en los extremos 5' y 3' del genoma viral (Deleersynder y col., 1997). La estructura esta conformada por proteínas estructurales y no estructurales, las proteínas estructurales: consisten en una proteína “core” o central y las glicoproteínas de la envoltura E1 y E2; las proteínas no estructurales consisten de NS2 (metaloproteínasa Zn²⁺), NS3 (proteasasa/helicasa), NS4A (parte de la

* VHA – picornavirus, VHB – hepadnaviridae, VHF – calcivirus.

** . VHC, VHA, VHE, y VHG son virus RNA de cadena lineal de una sola cadena y de sentido positivo, mientras que HBV es un virus DNA de doble cadena.

***El diámetro de VHA y VHE es de 27 nm, el VHB tiene 45nm (Lagging, 1998) y VHC Tiene un diámetro cercano a 80 nm.

proteasa NS3), NS4B, NS5A y NS5B (ARN dependiente de ARN polimerasa), (Lagging y col, 1998).

CICLO VIRAL.

VHC debe completar varios estadios para producir la progenie viral, (Fig. 2), estos incluyen:

a) Adhesión del virus a la célula huésped.

El primer paso que se requiere para infectar una célula es la adhesión viral. La forma por la cual VHC se adhiere a las células hepáticas no ha sido caracterizado; y no hay una evidencia clara que pueda definir el mecanismo de interacción del virus con las células del huésped (Lagging y col, 1998), quizá la adhesión pueda involucrar la interacción entre las proteínas de la superficie viral con un receptor sobre la célula hepática (Dartmouth College, 1998). Sólo después de que el VHC se ha adherido a la membrana, este puede entrar a la célula.

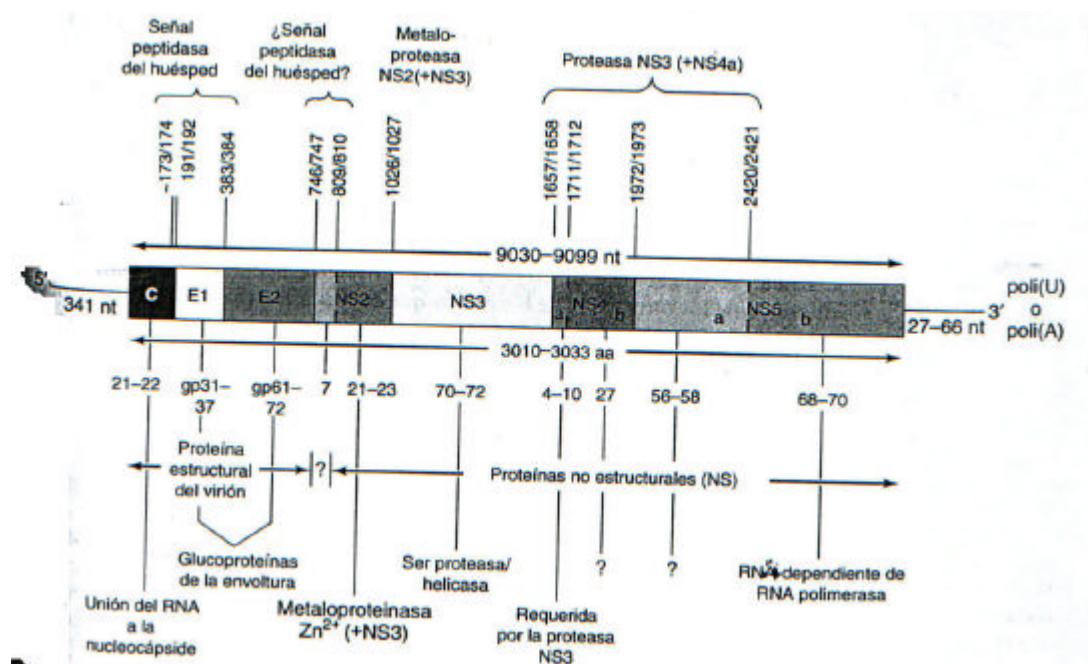


Figura 1. Organización genética del VHC. Se muestran los sitios de escisión de la poliproteína viral y las funciones de dicha proteína. (Tomado de Virología de Fields, 1996)

b) Entrada viral a los hepatocitos.

El proceso involucra la fusión de las glicoproteínas de la envoltura viral con la membrana celular del hepatocito, lo cual permite la entrada del genoma del VHC. Después de la entrada, el genoma del virus es depositado en el citoplasma de la célula huésped y liberado dentro de la célula huésped por disminución de la integridad de la proteína viral de envoltura; esto puede ocurrir ya sea por desintegración de la proteína de envoltura durante la fusión o por la acción enzimática de proteasas de la célula huésped (Dartmouth College, 1998).

c) **Replicación.**

Para que el virus pueda replicarse intracelularmente, debe primero formar las enzimas necesarias, debido a que los hepatocitos sólo permiten la replicación de ADN; esto se logra al leerse el genoma viral de forma directa en los ribosomas celulares, el genoma de VHC se traduce como si fuera un ARN mensajero, de ahí que se considere un genoma viral en sentido positivo. La traducción ocurre cuando el genoma viral, de VHC está localizado en el citoplasma de la célula huésped. Un dato muy interesante es que aunque la mayoría de los eucariotas requieren en el extremo 5' de su ARN mensajero un cap de metilo para iniciar la traducción, el genoma de VHC no lo requiere (Schaechter y col., 1998) Un ribosoma entra en el sitio y repone el 5' metil cap y dirige el ribosoma para iniciar la traducción, resultando en la producción de una poliproteína larga. Después que la poliproteína es producida, esta debe ser dividida en dos dominios de proteasa por enzimas tanto virales como de la célula huésped. El resultado de la actividad proteolítica es la producción de las proteínas estructurales y no estructurales. Las proteínas no estructurales están involucradas en la replicación del genoma viral y se conocen como ARN replicasa (Schaechter y col., 1998), y producen un ARN de sentido negativo del genoma de VHC, por lo tanto el genoma recién formado en sentido negativo, sirva como templado para la producción de altas cantidades de ARN con sentido positivo que serán subsecuentemente empaquetadas dentro de las cápsides o envoltura proteica para formar una nucleocápside (Dartmouth College, 1998). Durante la replicación, ocurren mutaciones dentro de la región hipervariable de los genes de la envoltura de VHC, las mutaciones en los genes E generan diferentes cuasi especies de VHC (Schaechter y col., 1998).

d) **Ensamblado.**

Las cápsides son formadas por la agregación de las proteínas virales llamadas capsómeros. Baumert y colaboradores proveen un modelo del ensamblado de las partículas del VHC, utilizando un sistema de expresión celular en insectos (baculovirus) en el que expresan el

cDNA de las proteínas estructurales E1 & E2 (Lagging y col, 1998). La expresión de las proteínas tiene como resultado el ensamblado viral en la célula del insecto, el cual es identificado por técnicas de inmunofluorescencia e inmunoblotting. Estos estudios sugieren que las glicoproteínas E1 y E2 son necesarias para la iniciación de la infección viral (Baumert y col., 1998) y que la adhesión y penetración virales están restringidas a células que portan un receptor específico para el virus, por lo que se sugiere que las glicoproteínas E1 y E2 interactúan con los receptores de la célula huésped.

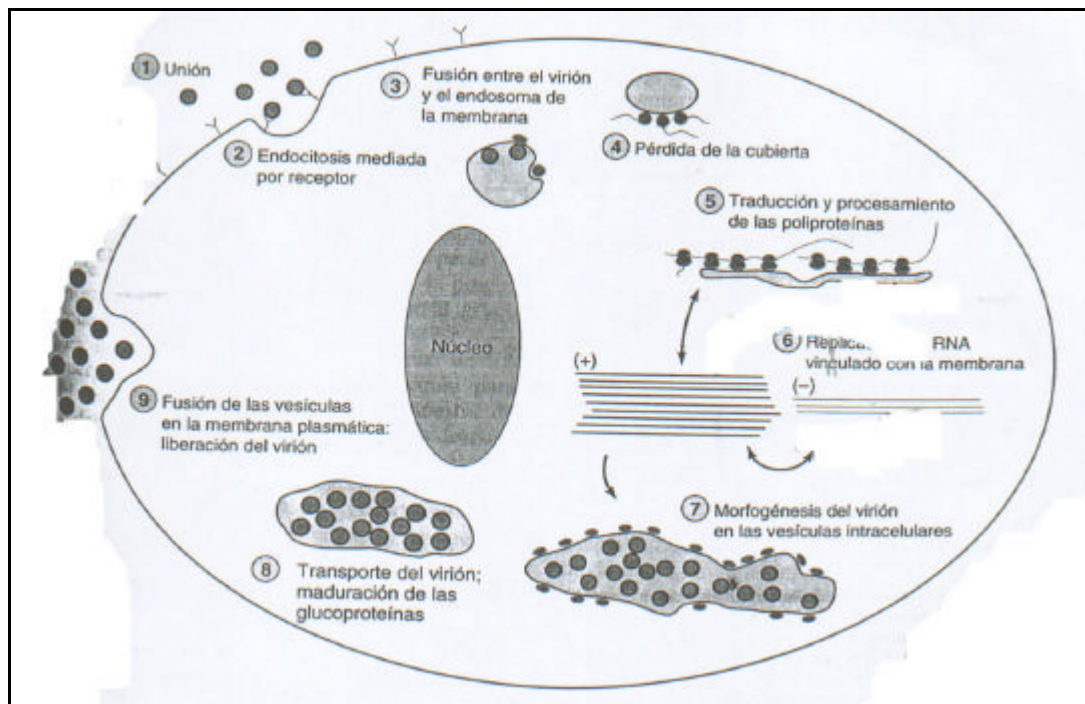


Figura 2. Ciclo de vida de un flavivirus.

El genoma de los flavivirus es en sentido positivo. Durante la replicación del virus se produce una proteína precursora grande a partir del genoma largo del ARNm; se corta gracias a la acción de las proteasas virales y del huésped para producir todas las proteínas del virus. El ensamblado de las partículas virales tiene lugar en las vesículas intracelulares. (Tomado de Microbiología Médica de Jawetz, 2002)

e) Salida viral.

El último estadio del ciclo de vida viral involucra la liberación de la progenie viral de las células huésped. La salida de la progenie de VHC involucra el anclaje de la progenie viral a la membrana plasmática de la célula huésped. La progenie entonces brota de la célula; un proceso que provee al virus de su envoltura lipídica (Dartmouth College, 1998). Las nuevas partículas virales serán subsecuentemente adheridas a otras células hepáticas y comenzará el proceso otra vez.

MECANISMOS DE TRANSMISIÓN.

VHC se ha encontrado presente en varios fluidos corporales de individuos infectados, se ha aislado de semen, orina, saliva, lágrimas y fluidos vaginales (Schawn, 1999); los fluidos orgánicos se consideran una fuente de transmisión de persona a persona, con un riesgo de transmisión muy bajo. Desafortunadamente también se ha encontrado en sangre, tejido al que se considera la mayor fuente de transmisión y razón por la cual la hepatitis C es considerada una enfermedad producida por sangre y/o sus productos. Como el VHC es principalmente transmitido por contacto con sangre infectada, órganos e instrumentos contaminados con el virus, hay ciertos grupos de la población quienes tienen mayor riesgo de estar infectados, como el personal de salud que trabaja en contacto con sangre, quienes están bajo un riesgo considerable de ser infectados.

Los principales mecanismos de transmisión y/o infección con VHC son:

- Contacto de sangre contaminada en abrasiones o cortadas sobre la piel.
- Pinchazo/piquete accidental en el cuerpo con instrumentos contaminados, como agujas.
- Uso de drogas intravenosas, las agujas contaminadas entre drogadictos es la mayor fuente de infección de VHC.
- El contacto con instrumentos contaminados en personas quienes se someten a tatuajes, perforación de la piel y/o cuerpo por aretes y aros, manicura de uñas; procedimientos que involucran la penetración de la piel y que representan un alto riesgo de esparcir y/o contraer la infección.
- Pacientes en instalaciones hospitalarias están en un riesgo incrementado de ser infectados.
- De acuerdo al CDC los pacientes que recibieron transfusiones sanguíneas antes de 1992 están frente a un riesgo incrementado de estar contaminados con el virus de la hepatitis C.
- Pacientes que recibieron el trasplante de algún órgano antes de 1992.
- Si se han recibido productos sanguíneos por problemas de coagulación, que hallan sido producidos antes de 1987.
- Pacientes con padecimientos renales pueden infectarse por contaminación de sangre dentro del equipo de diálisis.
- Pacientes con una enfermedad hepática existente.

- Otras actividades que involucran contacto con equipo contaminado pueden causar infección, con VHC, pero con un riesgo mucho más bajo.
- En el intercurso sexual, se debe considerar que el riesgo de infección parece ser más grande, si la pareja infectada tiene una carga viral elevada de VHC, ó si la pareja está bajo una infección aguda de hepatitis C (Schawn, 1999), aunque existen reportes de que raramente se transmite por esta vía.
- Durante el trabajo de parto, el riesgo de transmitirse de madre a hijo, es bajo.
- Se cree existen otros medios de transmisión, porque 40 a 50% de los sujetos con hepatitis C no presentan factores de riesgo identificables para esta infección. (Stuart Walter, 2000).

SINTOMATOLOGÍA.

El VHC puede causar infecciones agudas o crónicas. Después de la transfusión de productos sanguíneos contaminados con el virus de VHC, se puede detectar viremia entre una y tres semanas. La viremia dura de 4 a 6 meses para la infección aguda y más de 10 años para la persistente. En su forma aguda, la hepatitis C es similar a la hepatitis aguda A o B, pero presenta una menor respuesta inflamatoria y en general síntomas más leves. En la infección por VHC, la evolución a la cronicidad prevalece más que en la infección por VHB, y conduce con más frecuencia a enfermedad aguda y cirrosis (Murray, 1997). Después que el virus ha sido introducido en el huésped, llega específicamente a los hepatocitos, razón por la cual se asocia al VHC con enfermedades hepáticas. Después que un individuo ha sido infectado, el curso de la infección puede variar, las manifestaciones clínicas que se presentan tienen una amplia distribución y un gran alcance, la infección puede manifestar desde una mínima presentación de los síntomas ó puede llevar a varias enfermedades serias (Schaechter y col., 1998).

MANIFESTACIONES CLÍNICAS.

HEPATITIS AGUDA.

Una de las consecuencias de la infección por el virus de la hepatitis C es la hepatitis aguda, que tiene muy pocas manifestaciones clínicas; la mayoría de los pacientes presentan un incremento en los niveles de ALT (alanino transferasa sérica), enzima liberada en la sangre por las células hepáticas dañadas; cerca de 1/3 de los pacientes desarrollan ictericia y el

resto no presentan manifestaciones clínicas. Aunque la hepatitis aguda es resuelta por algunos pacientes, ésta usualmente se convierte en hepatitis crónica (Hoofnagle. 1999). El mecanismo de conversión aún no está plenamente identificado (Minuk y col., 1999), pero se cree que es un mecanismo semejante al utilizado por el VHB.

HEPATITIS CRÓNICA.

Los síntomas presentados por la infección crónica con VHC varían; un pequeño número de pacientes presentan síntomas y enfermedad. Los síntomas más frecuentes incluyen: fatiga, letargia, malestar, pérdida de energía ó vitalidad y cansancio fácil. Los síntomas menos frecuentes incluyen náusea, pérdida de apetito, dolor muscular, fiebre y pérdida de peso (Hoofnagle. 1999). Especial importancia tiene la infección crónica por ser la causa de otras enfermedades: cirrosis hepática, carcinoma hepatocelular (CHC) y crioglobulinemia mixta esencial.

CIRROSIS:

La cirrosis o cicatrización del tejido hepático, es una de las enfermedades causadas por la infección crónica con VHC. Algunos pacientes quienes desarrollan cirrosis nunca presentan ningún síntoma; en otros pacientes, muchos de los síntomas aparecen al desarrollarse la cirrosis, estos incluyen: fatiga, debilidad, retención de líquidos, orina oscura, ictericia y comezón (rash). Desafortunadamente la cirrosis lleva a un estado terminal de enfermedad hepática y la mayoría de los pacientes mueren de várices hemorrágicas y/ó otras complicaciones. El único camino para tratar la cirrosis es el trasplante de hígado, aunque usualmente ocurre reinfección en todos los pacientes (Hoofnagle. 1999).

CARCINOMA HEPATOCELULAR.

Se desarrolla más comúnmente en pacientes que presentan cirrosis hepática. Se dice que aproximadamente del 5 al 10% de los portadores crónicos de VHC tienen carcinoma hepatocelular por extrapolación y el 50% de los portadores con cirrosis lo pueden desarrollar (Minuk y col., 1999). Se han identificado factores de riesgo para el desarrollo de CHC en pacientes con cirrosis y VHC como: edad avanzada, homosexualidad, consumo de alcohol y coinfección de VHB y VHC. No se han identificado factores de riesgo para pacientes con infección crónica por VHC y sin cirrosis hepática. Se ha postulado que la reparación hepática continuada y la inducción del crecimiento celular durante la infección crónica por VHC, sean un factor predisponente al carcinoma hepatocelular primario. La patogenicidad del CHC por

la infección con VHC no es claramente entendida; se ha propuesto que la regeneración irregular de los hepatocitos es un factor más importante que la displasia de células hepáticas para la generación de esta enfermedad; los ciclos repetidos de regeneración hepatocelular y la necrosis, características de la hepatitis viral, inducen la proliferación de una población de hepatocitos que difieren en edad, crecimiento y actividad. (Shibata y col., 1998).

CRIOGLOBULINEMIA CELULAR ESENCIAL MIXTA.

Se ha descrito como “un desorden proliferativo de linfocitos B, caracterizado por activación policlonal de células B y producción de autoanticuerpos”, que consiste en la circulación sanguínea de crioglobulinas, las cuales son complejos inmunes compuestos de Ig-antiVHC unidas al VHC. Las crioglobulinas manifiestan una respuesta inmune del huésped, la cual resulta en varios síntomas, que incluyen: fatiga, dolor muscular y articular, artritis y salpullido de la piel. Cuando estos complejos inmunes se depositan en un órgano determinado se despierta una respuesta autoinmune contra el órgano en cuestión; ejemplo al localizarse en riñón, una respuesta inmune es despertada contra el riñón, causando glomerulonefritis (Hoofnagle, 1999).

HEPATITIS COLESTÁTICA FIBROSANTE.

La hepatitis colestática fibrosante (FCH) es una forma de disfunción hepática, encontrada después del trasplante de hígado en pacientes inmunocompetentes con infección crónica por VHC. El mecanismo de patogénesis de este desorden no está bien entendido, se cree es el resultado del efecto citopático directo de VHB y/o VHC sobre los hepatocitos, y que es fomentado por la inmunosupresión. Este desorden lleva a falla hepática y la muerte si no se realiza un segundo trasplante de hígado (Toth y col., 1998).

PATOLOGÍA HUÉSPED / ORGÁNO.

Después de que el virus penetra en las células blanco, puede producir lesión tisular y enfermedad por varios mecanismos. La replicación viral interfiere con la síntesis proteína celular normal y con la función de las proteínas celulares, lo que da lugar a la lesión y finalmente a la muerte de la célula infectada (efecto citopático). Los virus no citopáticos son capaces de producir lesiones latentes, debido a que residen en las células del huésped y elaboran proteínas que se reconocen como no propias (extrañas) y que estimulan la

inmunidad específica. Los virus citopáticos y no citopáticos pueden desarrollar diferentes tipos de respuestas inmunitarias específicas (Doberty y col., 1992).

Mecanismos principales de inmunidad frente a los virus:

1. La infección viral estimula directamente la producción de interferón de tipo I por las células infectadas, el cual inhibe la replicación viral (Doberty y col., 1992).
2. Las células citocidas naturales ("natural killer" = NK) lisan una amplia variedad de células infectadas por virus. Al inicio de una infección viral este es el recurso celular fundamental, antes de que se desarrollen respuestas inmunitarias específicas. La producción de IFN α de tipo I por las células infectadas es paralela a la actividad de NK, el IFN tipo I puede aumentar la capacidad de las células NK para lisar células diana infectadas. Las células NK reconocen y lisan eficazmente las células infectadas en las que por acción viral se inhibe la presentación de antígenos y la expresión del MHC de clase I; esto es debido a que las células NK se activan preferentemente a través de células negativas para clase I (Herman y col., 1991)

La inmunidad frente a las infecciones virales en general está mediada por una combinación de mecanismos inmunitarios humorales y celulares. Los anticuerpos específicos son importantes en la defensa contra los virus al inicio del curso de la infección y en la defensa contra virus citopáticos liberados tras la lisis de células infectadas. Los anticuerpos antivirales neutralizantes se unen a las proteínas de la envoltura o de la cápside e impiden la unión viral y penetración dentro de las células del huésped. Los anticuerpos opsonizantes pueden aumentar la eliminación fagocítica de partículas virales; sin embargo, también pueden promover la invasión viral de las células portadoras del receptor para el Fc, mecanismo de infección propuesto para HIV-1 en fagocitos mononucleares (Doberty y cols., 1992).

Los anticuerpos son un componente importante de la inmunidad frente a los virus, pero pueden no ser suficientes para eliminar muchas infecciones virales:

1. Los anticuerpos pueden ser eficaces frente a los virus antes de que los organismos penetren en las células o pueden bloquear la diseminación de una célula a otras, pero los virus que sobreviven y se replican intracelularmente son inaccesibles a los anticuerpos.

2. Generalmente es difícil transferir inmunidad antiviral a animales no estimulados o vírgenes mediante anticuerpos purificados.
3. La capacidad neutralizante de un anticuerpo *in vitro* a menudo muestra poca o ninguna correlación con su capacidad protectora *in vivo* (Spriggs y cols., 1996).

El principal mecanismo de inmunidad específica frente a las infecciones virales establecidas, especialmente con virus no citopáticos son las clonas de linfocitos T (CTL), de hecho las funciones fisiológicas esenciales de los CTL es la vigilancia de las infecciones virales. La mayor parte de las CTL específicas de los virus son células CD8+ que reconocen antígenos virales citosólicos sintetizados endógenamente y asociados a moléculas del MHC de clase I en cualquier célula nucleada. La total diferenciación de los CTL CD8+ requiere la producción de citoquinas por las células colaboradoras CD4+ y/o coestimuladores expresados sobre las células infectadas. Los efectos antivirales de las CTL se deben a la lisis de las células infectadas, la introducción de enzimas dentro de las células infectadas que degradan los genomas virales y a la secreción de citoquinas con actividad de interferón. Los anticuerpos y los CTL colaboran en la protección del huésped frente a los virus y pueden ser específicos para diferentes antígenos virales; los anticuerpos bloquean la unión del virus y su entrada en las células del huésped, y los CTL inhiben la replicación viral matando a las células infectadas (Zinkernagel y cols., 1996). En algunas infecciones por virus no citopáticos, los CTL pueden ser los responsables de la lesión tisular. Existe una similitud entre el comportamiento de la infección por VHB y el VCML (virus de la coriomeningitis linfocitaria), personas con inmunodeficiencia que se infectan no desarrollan la enfermedad pero se vuelven portadores capaces de transmitir la infección a personas sanas; en ambas situaciones se estimula el desarrollo de CTL específicos que lisan las células de los tejidos que infectan durante un intento fisiológico para erradicar la infección viral. Por lo tanto, los pacientes deficientes en células T infectados, se vuelven portadores crónicos del virus, pero no desarrollan lesiones patológicas mientras que individuos normales sí desarrollan la enfermedad. Esta situación contradice la situación normal, en la que individuos inmunodeficientes son más susceptibles a las enfermedades infecciosas que los individuos normales. El hígado de los pacientes con hepatitis activa crónica y aguda contienen grandes cantidades de células T CD8+, situación que se comprueba porque se pueden aislar CTL específicos del virus de las hepatitis y restringidos por el MHC de clase I a partir de biopsias hepáticas y hacerles proliferar *in vitro* (Spriggs y col., 1996).

Las respuestas inmunitarias a las infecciones virales pueden estar implicadas en la producción de enfermedad de dos formas:

- 1º. Como consecuencia de la infección persistente con algunos virus (ej. VHB), existe formación de complejos inmunitarios circulantes, compuestos de antígenos virales y anticuerpos específicos, que provocan una vasculitis sistémica.
- 2º. Algunos virus contienen secuencias de aminoácidos que también se presentan en algunos antígenos propios, este mimetismo molecular puede conducir a la producción de respuestas inmunitarias contra los antígenos propios. (Zinkernagel y col., 1996).

Los virus han desarrollado diversos mecanismos para evadir la inmunidad del huésped, especialmente la vigilancia por las células T:

- Variación antigénica.
- Inhibición de la presentación de antígenos proteicos citosólicos asociados a MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase I.
- Algunos virus producen moléculas que inhiben la inmunidad innata y/o específica.
- Los virus pueden infectar, lisar, inactivar a las células inmunocompetentes. (Zinkernagel y col., 1996).

La respuesta del huésped contra VHC involucra ambas respuestas: la inmune celular y la humoral. La respuesta inmune celular destruye las células infectadas por virus, mientras que la respuesta humoral es responsable de la formación de los anticuerpos contra el virus. Desafortunadamente, la habilidad de VHC para causar una infección persistente en la mayoría de los pacientes indica que el virus es capaz de desafiar y/o evadir estas respuestas inmunes, se piensa que probablemente esto ocurre por la coexistencia de múltiples tipos virales, que permiten al virus escapar a la respuesta inmunológica de su huésped (Tsai y col., 1998). Por lo tanto, los anticuerpos contra el VHC no son protectores, la inmunidad frente al VHC puede no ser duradera y sí puede desencadenar otras patologías de origen inmunológico por la formación de complejos inmunes circulantes.

No está claro el mecanismo sobre como el VHC evade la respuesta inmune, sin embargo, se ha propuesto que puede desarrollar alguno de los siguientes mecanismos (Tsai y col., 1998):

- Evasión de la respuesta inmune que incluye la persistencia del virus en un sitio inmunológicamente privilegiado extrahepático.
- Expresión restringida de antígenos virales o proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC) sobre hepatocitos infectados.
- Expresión emergente de variantes virales con mutaciones en los epítomos reconocidos por los linfocitos T citotóxicos ó en sitios de reconocimiento de anticuerpos, los cuales posiblemente son expresados por presión selectiva del sistema inmune (Tsai y col., 1998).

De los mecanismos propuestos, la habilidad del VHC por mutar puede ser la razón por la cual este es capaz de evitar y/ó engañar la respuesta inmune del huésped y así persistir crónicamente en el huésped. La respuesta inmune desarrollada contra el virus causante de la hepatitis C, marca la diferencia entre la proliferación y la evasión de partículas virales por la célula blanco; se ha demostrado que el sitio crítico para la neutralización de VHC está localizado en la región hipervariable de la proteína de envoltura ó dominio neutralizante, y que hay desarrollo de anticuerpos neutralizantes contra VHC altamente específicos y de efectividad transitoria, porque son incapaces de prevenir la formación de nuevas cadenas resistentes a la neutralización, lo que resulta en infección crónica. La marcada variación en ésta región del genoma, específicamente por mutaciones en las regiones hipervariables de los genes de envoltura durante la replicación, permite al virus existir con variantes inmunológicas diferentes o quasiespecies (Sansom y col., 1998), y así escapar continuamente al ataque inmune, dando como resultado una infección persistente en la mayoría de los pacientes. La habilidad del VHC para mutar es la mayor razón por la que se dificulta producir una vacuna efectiva contra el virus (Schaechter y cols., 1998). La evidencia de la pobre efectividad del desarrollo de una vacuna se manifiesta porque el blanco de los anticuerpos inducidos podrá ser constantemente cambiado y por lo tanto, evadida la respuesta humoral.

Se ha demostrado que en pacientes coinfectados con VHC y VIH, los títulos virales de VHC incrementan conforme el sistema inmunológico de los pacientes se deteriora, sin embargo, el incremento de la carga viral no se correlaciona con el empeoramiento de la enfermedad hepática. Esto sugiere que el daño hepático es consecuencia del problema inmunológico, más que un efecto citopático del virus (Tsai y col., 1998).

DIAGNÓSTICO.

A diferencia del VHB y VHA, las pruebas disponibles para el diagnóstico de VHC no pueden detectar la infección aguda, situación que complica la efectividad de los procedimientos de rastreo, lo cual es muy significativo sobre todo para los bancos de sangre, ya que los productos que ahí se manejan, son la principal causa de transmisión de la enfermedad.

Actualmente el diagnóstico de VHC involucra varios factores:

1. Observación directa de los síntomas clínicos.

La infección por virus de hepatitis C se inicia de 6 a 8 semanas después de la exposición a líquidos corporales contaminados con este virus. Cerca del 75% de los sujetos infectados no sufren enfermedad clínica aparente. En sujetos sintomáticos las manifestaciones de hepatitis C aguda son semejantes pero menos graves que las de hepatitis B aguda; la mayoría presenta poca ó ninguna ictericia y la tasa de mortalidad es de tan sólo 1% en casos de enfermedad fulminante. (Minuk y col., 1999).

2. Diagnóstico histológico.

Se ha demostrado que la enfermedad hepática asociada a hepatitis C es muy leve en la mayoría de los pacientes y que sólo el 13% tienen severas lesiones histológicas a pesar de que la duración promedio de la infección excede de 15 años, la biopsia de hígado también es útil para:

1. Confirmar el diagnóstico.
2. Valorar la severidad de la enfermedad (necroinflamación y fibrosis).
3. Valorar la eficacia terapéutica.
4. Evaluar posibles procesos concomitantes.
5. Excluir diagnósticos diferenciales como hepatopatía inducida por alcohol.
6. Establecer la etapa de la enfermedad antes del tratamiento.

3. Ensayos en muestras sanguíneas, principalmente séricas.

- a) **Enzimas hepáticas.** Los niveles anormales de alaninoaminotransferasa (ALT) en suero son la primera indicación de infección por el VHC, pero no se requieren para un diagnóstico positivo. La elevación de las enzimas hepáticas es una prueba inespecífica ya que su elevación puede tener varias causas y diferentes virus causantes de hepatitis las elevan.

- b) **Anticuerpos totales y específicos.** Referidos como prueba de **ELISA** (enzyme-linked-immunoabsorbent-assay), que detectan anticuerpos totales y específicos contra el virus de hepatitis C alrededor de 3 meses después del inicio de la infección (Minuk y col., 1999) y se utilizan principalmente para pruebas de tamizaje y diagnóstico preliminar de infección en pacientes de alto riesgo. Estos ensayos pueden arrojar resultados falsos negativos, dicho de otro modo, pueden darse resultados donde el paciente no presenta anticuerpos contra el VHC, porque la determinación se realiza meses antes de que los anticuerpos puedan ser detectados. Los anticuerpos se pueden detectar dentro de las 6 a 8 primeras semanas después del contagio, pero no siempre existen en los individuos virémicos; sólo el 60% de los pacientes desarrollan anticuerpos durante las primeras 15 semanas y 10% de ellos permanecen negativos hasta 6-12 meses. Esto sugiere que las pruebas pueden ser útiles para identificar a la enfermedad por VHC sólo cuando el paciente desarrolla la formación de anticuerpos.
- c) **Ensayo de Inmunoblot recombinante (RIBA).** Se detectan los anticuerpos específicos para cada una de las proteínas virales, utilizado para resolver falsos positivos por pruebas de ELISA en pacientes asintomáticos, donadores de sangre o pacientes de bajo riesgo (Gretch, 1997).
- d) **Ensayos moleculares.** Para la detección cualitativa y cuantitativa de genomas virales, basados en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes. Los ensayos moleculares se emplean para:
1. Confirmar la infección:
 - En pacientes con ELISA positivo pero RIBA indeterminado.
 - En pacientes con resultado negativo por ELISA en quienes se sospecha infección aguda.
 - En pacientes con hepatitis sin causa identificable.
 - En pacientes con razones desconocidas para resultados falsos negativos en pruebas con anticuerpos.
 2. Confirmar viremia en pacientes con hepatitis C crónica.
 3. Vigilar la eficacia de los regímenes de tratamiento (Minuk y col., 1999).

La presencia de RNA del virus de Hepatitis C en el suero proporciona el indicador más fiable de la enfermedad; ya que la respuesta bioquímica (niveles normales de ALT) y la respuesta virológica (ARN de VHC no detectable), no siempre se correlacionan.

Dentro de los ensayos moleculares tenemos a la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y la RT-PCR, (variación de la PCR sobre la base de la secuencia conocida del VHC – virus RNA) que permiten detectar la presencia de ARN del VHC en individuos seronegativos, y que se ha convertido en un instrumento clave para diagnosticar la infección por VHC (Murray y col., 1997), con la ventaja de que las determinaciones pueden ser cualitativas y cuantitativas. Usualmente la cantidad de virus en la sangre ó la carga viral es vista como un indicador de la severidad de la enfermedad viral; pero estudios indican que mientras la carga viral puede revelar la efectividad de las drogas que bloquean la replicación viral, ésta puede no ser un verdadero indicador de la severidad de la enfermedad; concluyendo que la cuantificación del ARN juega un papel en la dinámica viral y puede proveer una predicción temprana (24 a 48 horas) de una respuesta virológica sostenida. Sin embargo, la progresión de la enfermedad es más compleja y no depende simplemente de la viremia (Araujo y col., 2002). El Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo en el 2002 publicó que la carga viral de VHC es más que un valor numérico y que no correlaciona con la evolución histológica de la enfermedad y que el uso de la cuantificación viral del ARN como un predictor ó determinante de severidad de esta enfermedad es incorrecta o mejor dicho no adecuada y de un valor relativo.

Se ha establecido un índice de riesgo de cirrosis coexistente en pacientes infectados con VHC, utilizando un examen físico y criterios de laboratorio; en este índice se da un punto por cada una de las condiciones siguientes: presencia de "spider nevi", ginecomastia, encefalopatía, ascitis, albúmina menor de 3.5 g/dl, conteo plaquetario por debajo de 150 000, tiempo de protrombina 2 segundos mayor que el valor del control y bilirrubina total mayor de 1.5 mg/dl. Un puntaje de cero indica un bajo riesgo de cirrosis concomitante y un puntaje mayor de 3 indica una alta probabilidad de enfermedad hepática avanzada. Agregado al criterio anterior se ha encontrado que el riesgo de enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD) en pacientes infectados con VHC incluyen: obesidad coexistente, diabetes mellitus tipo II, hipertensión e hipertrigliceridemia, no observándose diferencias en relación al genotipo, carga viral y elevación de las aminotransferasas entre pacientes con VHC y NAFLD cuando se compararon con solo infección por VHC.

El desarrollo eventual de una enfermedad hepática severa por VHC puede ser bajo, en una persona promedio infectada es poco probable el desarrollo de cirrosis y otros problemas serios de salud; así lo indica una revisión de las estadísticas de este tipo de pacientes. Sin

embargo, esto no es alentador, lo ideal sería predecir cuales pacientes pueden ó no, progresar rápidamente al desarrollo de alteraciones hepáticas irreversibles, lo cual no es posible. Los médicos deben decidir cuando administrar a sus pacientes medicamentos potencialmente tóxicos para disminuir el daño causado por la infección hepática por VHC. Es difícil entender como la enfermedad hepática se desarrolla, porque el proceso entero puede durar décadas y muchos pacientes son diagnosticados después de que han estado infectados por algún tiempo. Una estimación previa de cuando los pacientes infectados pueden desarrollar enfermedad hepática, han sido basados sobre pacientes ya diagnosticados con enfermedad hepática. Los pacientes que acuden a la consulta médica, porque se sienten ó ya están enfermos, podrían progresar más rápidamente; mientras que los pacientes con VHC, lo suficientemente saludables dentro de la población general, pueden permanecer libres de enfermedad por largos períodos. El hecho que mucha gente infectada con VHC no progrese a cirrosis podría ser una de las consideraciones más importante en decisiones individuales acerca de empezar ó no el tratamiento, considerando los costos, los efectos colaterales potenciales y la limitada efectividad de la terapia disponible.

TRATAMIENTO.

No existe una droga disponible para prevenir la infección ó para curar la Hepatitis C. El VHC tiene cualidades que dificultan la producción de una vacuna, como la habilidad para mutar y la existencia de varios genotipos (Schaechter y col., 1998). El tratamiento y su duración se adaptan a las características de cada paciente según las variables de genotipo y carga viral. Actualmente hay algunos tratamientos prometedores para individuos infectados, como lo es el Interferón alfa (IFNa), las opciones de tratamiento son:

- a) monoterapia con IFNa (2a o 2b),
- b) terapia combinada de IFNa (2a o 2b) + ribavirina,
- c) monoterapia con IFNa (2a o 2b) en forma su pegilada¹, y
- d) terapia combinada de IFNa (2a o 2b) pegilado + ribavirina.

Actualmente se investigan una serie de terapias diferentes para el tratamiento de hepatitis C, ya sea como monoterapia ó en terapias combinadas; éstas incluyen: amantadina, interleucina-12, micofenolato de mofetilo, diclorhidrato de histamina, limosina alfa y VX-497.

¹ Es un IFNa modificado molecularmente por unión de moléculas de polietilenglicol (PEG) sin perder la actividad biológica de la molécula nativa.

El tratamiento con interferón alfa y ribavirina ha erradicado la infección crónica de VHC en algunos pacientes y han llevado a una reducción en la incidencia de carcinoma hepatocelular en tales pacientes. El interferón alfa recombinante es el único tratamiento efectivo identificado para el VHC, no se dispone de ningún otro, excepto las medidas de soporte; pero la mayoría de los pacientes quienes mejoran durante el tratamiento, experimentan recurrencias al suspender el fármaco, además la mayoría de ellos presentan reacciones adversas al tratamiento (Stuart Walter, 2000). El modo de acción del interferón no se conoce (Koshy y col., 1981); se cree que bloquea la producción y la liberación de los virus. Se ha encontrado que dos horas después de que se ha inyectado IFN- α disminuye la carga viral de individuos infectados, pero se sigue investigando el mecanismo relacionado con este fenómeno. La terapia con interferón también parece ser efectiva en pacientes quienes ya presentan cirrosis. Algunos autores sugieren que existen respuestas tan positivas que incluso al mes de tratamiento se han obtenido resultados como "VHC – ARN indetectable"; desafortunadamente como la terapia con IFN es continuada hay una disminución a la respuesta a través del período de tratamiento. Para acrecentar la efectividad del IFN, se ha combinado con drogas como la ribavirina (nucleósido oral análogo), combinación que parece ser prometedora, ya que el rango de respuesta sostenida se incrementa al doble en comparación con la monoterapia con interferón en un grupo similar de pacientes.

Los lineamientos de la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (EASL) y del Instituto Nacional de Salud (NIH) en Estados Unidos, indican que deben ser tratados:

- Pacientes con necroinflamación moderada/severa y/o fibrosis, que presentan ARN de VHC detectable en suero. Se sabe que existe menor posibilidad de respuesta en los casos con niveles elevados de viremia y/o genotipo 1, pero estas características no deben ser consideradas como una razón para no dar tratamiento.
- Pacientes sin tratamiento previo, donde la terapia combinada de IFN α más ribavirina (RBV) debe ser la primera línea de tratamiento, a menos que esté contraindicado.
- Pacientes que presentan recidiva después de monoterapia con IFN α también deben ser tratados con la terapia combinada ó recibir una dosis más alta de IFN α durante un período de 12 meses.
- Las metas de la terapia para infección crónica por VHC son: erradicar el virus y/o hacer más lenta ó revertir la progresión de la enfermedad, mejorar la histología hepática,

reducir el riesgo de carcinoma hepatocelular y mejorar la calidad de vida relacionada con la salud.

La respuesta se mide al final del tratamiento y al final de un seguimiento de 24 semanas. Quienes no presentan ARN de VHC detectable en suero al final del seguimiento, se consideran como respuesta virológica sostenida (Lindsay, 1997). La respuesta al tratamiento se puede predecir, diversos estudios han identificado factores pretratamiento que están relacionados con falla de la terapia con IFNa:

1. Relacionados al paciente: sexo masculino, edad avanzada, descendientes de africanos, consumo de alcohol y peso elevado.
2. Factores específicos de la enfermedad: fibrosis y cirrosis avanzadas y crioglobulinemia mixta. (Zeuzem y col., 2000).
3. Factores virales (no esclarecidos por completo): carga viral elevada, genotipo viral y coinfección de VHC y VIH.

Generalmente es aceptado que la disminución temprana de los niveles virales se asocia con un pronóstico positivo de respuesta virológica sostenida, mientras que la falta de respuesta temprana se asocia con un pronóstico pobre de respuesta virológica sostenida. (Karino y col., 1997, Fallows y col., Lee y cols., Min y cols., Neumann y cols., y Saito y col., 2000, Ferenci y cols., y Fried y col., 2001) Se considera que pacientes con genotipos 1 y 4 tienen una enfermedad más difícil de tratar que los infectados con genotipos 2 y 3 (Koshy y col., 1981, Davis y col., 1997, Shiratori y col., y Zylberberg y col., 2000, Nishiguchi y col., en 2001). Los pacientes coinfectados con VHC y VIH con frecuencia presentan una velocidad acelerada de la hepatopatía, probablemente debido a la inmunodeficiencia asociada a la infección por VIH. Aunque el tratamiento de estos pacientes con IFNa ha mostrado un índice de respuesta a la terapia similar a la de los pacientes sin coinfección con VIH (Soriano y col., 1997), los pacientes coinfectados con cuentas bajas de células CD4+ y viremia por hepatitis C elevada tienden a presentar una respuesta más pobre a la terapia. (Soriano y col., 1999).

PCR EN TIEMPO REAL.

Por definición la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), permite la amplificación *in vitro* de una secuencia específica de ADN y se realiza mediante el

uso de un par de oligonucleotidos iniciadores que flanquean la secuencia de ADN a amplificar, y de ciclos repetidos de síntesis de nuevas cadenas de ADN por acción de una ADN polimerasa. Básicamente cada ciclo de amplificación se divide en 3 etapas, en el siguiente orden: la desnaturalización, donde se separan las cadenas de ADN por medio de elevación de la temperatura; segundo el alineamiento, donde los iniciadores se hibridan, en sentido y antisentido con las secuencias complementarias que flanquean la región a amplificar; y por último la extensión, donde por acción de la ADN polimerasa se sintetizan nuevas cadenas de ADN complementarias a la cadena molde a partir de los iniciadores.

El éxito de una PCR depende en gran medida de la optimización de los diferentes parámetros involucrados en el proceso:

- ADN molde – es requerida la presencia de por lo menos una cadena completa del ADN con la secuencia a amplificar y con una cantidad mínima de contaminantes para no inhibir la reacción de polimerización.
- Iniciadores – su diseño es un parámetro esencial para la obtención reproducible de un producto de amplificación específico. Los iniciadores deben corresponder a secuencias únicas en la región a amplificar, particularmente en los extremos 3' y deben cumplir con una serie de requisitos entre ellos destacan que la temperatura de desnaturalización para ambos iniciadores debe ser similar y que entre ellos no debe haber complementariedad para evitar la formación de dímeros que interfieran en la amplificación.
- dNTP's (2'-desoxirribos nucleosido 5'-trifosfato) – la concentración de la mezcla equimolar de los cuatro sNTP's deber ser suficientemente alta para permitir la realización de todos los ciclos de amplificación (20-200 μ M).
- ADN polimerasa – requerida para la amplificación de las nuevas cadenas.
- Iones Mg^{++} - que participan como cofactores de la *Taq* ADN polimerasa, y regular la actividad y la fidelidad de la enzima.
- Parámetros de los ciclos de amplificación: primordialmente controlar los tiempos y las temperaturas utilizadas, durante los ciclos de amplificación.

Aplicaciones más comunes de la PCR:

- RT-PCR ó transcriptasa en reversa de la reacción en cadena de la polimerasa. Descrita en 1999 por Freeman, es una técnica muy sensible que permite analizar la expresión

génica ó detectar secuencias poco frecuentes en un genoma, utilizando como templado el ARN total ó mensajero.

- PCR inversa. Descrita en 1997 por Ming y colaboradores, permite amplificar las secuencias desconocidas que flanquean una región conocida de ADN.
- Tamizaje diferencial. Descrita por Liand and Pardee en 1997, permite identificar genes que se expresan de manera diferencial son conocer su secuencia a partir de un ARN mensajero.

Las aplicaciones anteriores además de su aplicación a la amplificación de secuencias en muestras celulares, favorecen la amplificación de genomas virales (ADN o ARN), lo cual ha llevado la metodología de la PCR y/o RT-PCR a ser una herramienta muy útil y casi indispensable en el diagnóstico de enfermedades virales. El diagnóstico del agente causal de la infección por el virus de Hepatitis C por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), está basado en la amplificación de regiones específicas del genoma del patógeno. En la PCR en tiempo real, el producto obtenido por la amplificación es detectado mediante compuestos fluorescentes, los cuales usualmente están unidos covalentemente a oligonucléotidos, que se unen específicamente al producto amplificado. El monitoreo de la intensidad de la fluorescencia durante la reacción de PCR en tiempo real, permite la detección y cuantificación de los productos acumulados sin tener que reabrir el tubo de reacción después de la corrida de PCR.

CARACTERÍSTICAS DE LA RT-PCR EN TIEMPO REAL.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha revolucionado la detección de ADN y ARN. Tan solo una copia de una secuencia particular puede ser específicamente amplificada y detectada. Teóricamente, hay una relación cuantitativa entre la cantidad inicial de secuencia blanco y la cantidad del producto por PCR a cualquier ciclo dado. El desarrollo de la PCR cuantitativa en tiempo real ha eliminado la variabilidad tradicionalmente asociada con la PCR cuantitativa, permitiendo la cuantificación de productos de PCR de forma de rutinaria y confiable. (Livak y col., 1997)

La reacción en cadena de la polimerasa de la transcriptasa inversa (RT-PCR) es el método más sensible para la detección de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) específico (Wang y col., 1999). En contraste con las técnicas clásicas tales como el análisis del

Northern blot y los ensayos de protección de RNasa, los cuales requieren grandes cantidades de ARN total. El ensayo de RT-PCR es capaz de cuantificar niveles de RNAm en muestras tan pequeñas como una célula individual. La reciente introducción de técnicas de fluorescencia a la PCR, en unión con la instrumentación capaz de amplificar, detectar y cuantificar los niveles de RNAm, han formado las bases de los ensayos cinéticos o ensayos de RT-PCR en tiempo real (Holland y col., 1991). La RT-PCR en tiempo real es generalmente el método más sensible para la detección de ARNm de poca abundancia (Weihong y col., 2002).

El pionero del análisis cinético por PCR fue Higuchi a principios de los años noventa, con la construcción de un sistema que detecta productos de PCR conforme estos se acumulan. Este sistema en tiempo real incluye: una sonda fluorogénica que se intercala con los productos de cada reacción de amplificación, un ciclador térmico asociado a un sistema de emisión láser para irradiar las muestras y un detector de la fluorescencia resultante en cámara fría controlada por una computadora.

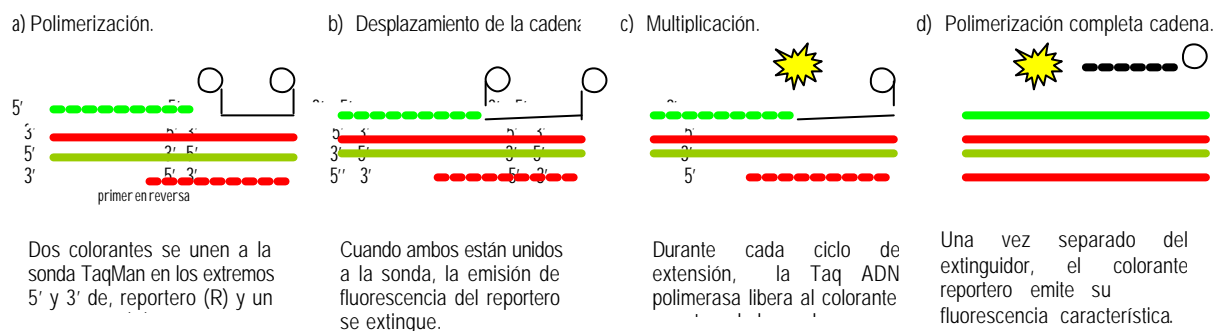


Figura 3. Actividad química de la sonda fluorogénica 5 nucleasa. Representación de la estructura dependiente y de cómo se realiza la polimerización asociada a la actividad 5' a 3' de la nucleasa *Taq* DNA polimerasa cuando actúa sobre una sonda fluorogénica, durante la fase de extensión de la PCR en tiempo real. (Tomado de Lyamicher y col., 1993).

La amplificación produce cantidades incrementadas de ADN de doble cadena los cuales unen una sonda fluorogénica, resultando en un incremento en la fluorescencia. Graficando el incremento de fluorescencia contra el número de ciclo, el sistema produce puntos de amplificación que proveen una representación más precisa del proceso de PCR, que la acumulación de productos después de un número fijo de ciclos (Higuchi y col., 1993).

La cuantificación de los transcritos de ARNm por RT-PCR en tiempo real puede ser absoluta o relativa. A diferencia de la RT-PCR de punto final, la cuantificación en tiempo real es definida por el número de ciclos de entrada ó mejor conocido como Ct, a una entrada fija donde la amplificación por PCR está todavía en fase exponencial y los componentes de la reacción no limitan la amplificación del gen. La cuantificación absoluta requiere la construcción de una curva estándar absoluta para cada amplicón individual, para calcular el número preciso de copias transcritas de ARNm, por célula o unidad de masa de tejido.

Se han desarrollado dos métodos de cuantificación relativa:

- a) El método de la curva estándar, donde la cantidad de entrada de muestra desconocida de un gen específico es calculada en la curva estándar, y normalizada a la cantidad de entrada de un gen de referencia, el cual también es calculado en su curva estándar.
- b) El método comparativo de Ct, donde se detecta la expresión relativa de un gen con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, la cual se basa en el principio de que la eficiencia de la amplificación de los genes de referencia y el blanco es aproximadamente igual y que la eficiencia de la amplificación es cercana a 1. Este método es utilizado cuando la eficiencia de la amplificación de un gen de referencia es igual a la del gen blanco. Cuando la eficiencia de la amplificación no es igual en el gen de referencia que en el gen blanco, se utiliza el método de la curva estándar (Livak y col., 1997). Los valores de Ct son muy reproducibles porque la entrada se realiza en la fase exponencial de la PCR; la entrada intercepta el punto de amplificación en la región donde hay una relación lineal entre el *Log* de cambio en fluorescencia y el número de ciclos. En la fase exponencial los componentes de la reacción no son limitantes y las reacciones del replicado exhiben resultados uniformes y reproducibles (Weihong y col., 2002).

Las sondas fluorogénicas acopladas al ADN tienen la ventaja de que se requiere una hibridización específica entre la sonda y el blanco para generar una señal fluorescente, como se muestra en la Fig. 3. Así, con las sondas fluorogénicas, una amplificación no específica debida a acarreo, artefactos o formación de dímeros del "primer" no generan una señal similar. Otra ventaja de las sondas fluorogénicas es que pueden estar marcadas con componentes reporteros diferentes y se pueden utilizar para la amplificación de distintas secuencias que pueden ser detectadas en una sola reacción de PCR. La desventaja de las sondas fluorogénicas es que deben ser sintetizadas diferentes sondas para detectar

diferentes secuencias. Independientemente del mecanismo de unión, hay dos requerimientos para un fluoróforo de unión al ADN para detección por PCR en tiempo real: primero que se incremente la fluorescencia cuando se unen al ADN de doble cadena.(ADNs) y segundo que no inhiba la PCR.

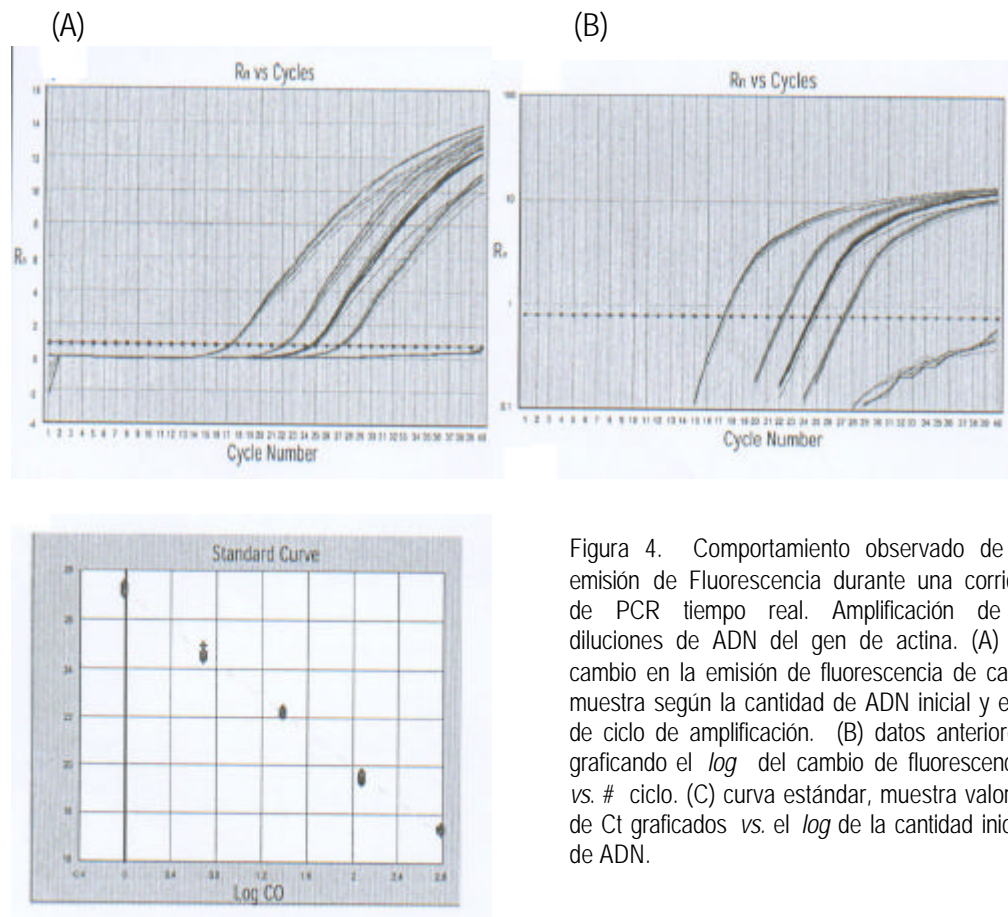


Figura 4. Comportamiento observado de la emisión de Fluorescencia durante una corrida de PCR tiempo real. Amplificación de 5 diluciones de ADN del gen de actina. (A) el cambio en la emisión de fluorescencia de cada muestra según la cantidad de ADN inicial y el # de ciclo de amplificación. (B) datos anteriores, graficando el *log* del cambio de fluorescencia vs. # ciclo. (C) curva estándar, muestra valores de Ct graficados vs. el *log* de la cantidad inicial de ADN.

Ambos, la ventaja y la desventaja de utilizar un fluoróforo de unión al ADN para detección por PCR en tiempo real, son que estos permiten la detección de cualquier ADNs generado durante la PCR; esto significa versatilidad, porque el mismo fluoróforo puede ser utilizado para detectar cualquier producto amplificado. Así, cuando un fluoróforo de unión al ADN se utiliza para la detección en tiempo real de cualquier ADN, cualquier evento que favorezca la aparición de bandas espurias sobre los geles electroforéticos, podría generar señales falsas positivas. Otro aspecto de la utilización de fluoróforos de unión al ADN es que múltiples fluoróforos unen a una molécula amplificada única, incrementando la

sensibilidad de la detección de productos de amplificación. Una consecuencia de la utilización de fluoróforo de unión múltiple, es que la cantidad de la señal es dependiente de la masa de ADNds producido en la reacción. Así, si la eficiencia de la amplificación es la misma, la amplificación de un producto grande podría generar más señal que un producto corto (PE Biosystems). Esto en contraste con el uso de una sonda fluorogénica, en la cual un sólo fluoróforo es liberado por extinción para cada molécula amplificada sintetizada, independientemente de su longitud.

Los principios básicos de la cuantificación en tiempo real son tres (Observar Fig. 4):

- La cantidad inicial de ADN genómico.
- La pronta acumulación de productos, detectado en el proceso de PCR.
- El bajo valor de C_t . (Higuchi y col., 1993)

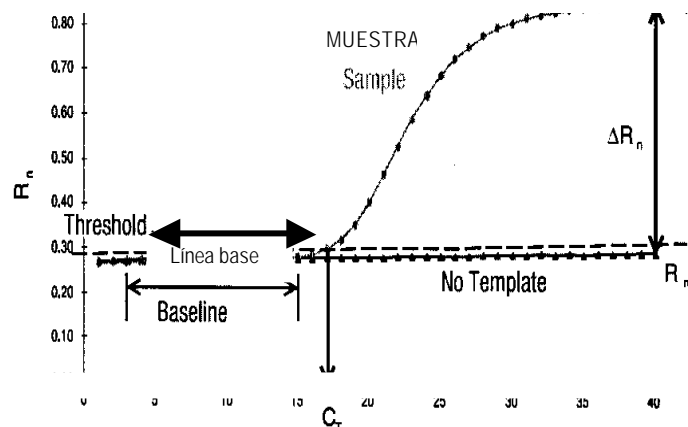


Figura 5. Cuantificación de productos por PCR en tiempo real. Modelo representativo de una sola gráfica de amplificación mostrando los términos utilizados en la PCR tiempo real. La curva de amplificación es la curva de la señal de fluorescencia contra el número de ciclo. En los ciclos iniciales donde no hay un cambio significativo en la señal de fluorescencia se define como *hreshold* ó línea base de la curva de amplificación. El incremento de fluorescencia arriba de la línea base indica detección de productos acumulables por PCR. El método permite fijar un punto de corte por arriba de la línea basal de la emisión de fluorescencia, ó C_t , que se define como el número de ciclo al cual la fluorescencia pasa el punto de corte fijado. Una curva del Log del número de copias inicial del blanco ó muestra para un juego de estándares versus C_t es una línea recta. La cuantificación de la cantidad del blanco en muestras desconocidas es acompañada por medir C_t y utilizar la curva estándar para determinar el número de copias iniciales. (Tomado de Higuchi, 1992).

La habilidad para monitorear el proceso del PCR en tiempo real completamente revoluciona el camino en relación a la cuantificación de ADN y ARN por PCR. Las reacciones se caracterizan por un punto en el tiempo durante el ciclo cuando la amplificación de un producto por PCR se detecta por primera vez, como la cantidad de producto de PCR acumulado después de un número fijo de ciclos. Ver la Fig. 5. Cuando existe un alto número de copias del ácido nucleico blanco, se observa tempranamente un significativo incremento en la fluorescencia.

El desarrollo de PCR competitivo fué manejado como más confiable sobre las mediciones de punto final. Las ventajas de las determinaciones competitivas en tiempo real son:

- El determinar los valores de Ct a través del seguimiento de la cinética de PCR en tiempo real, elimina la necesidad de un competidor para ser coamplificado junto con el blanco.
- La cuantificación se puede realizar por más de un método básico de preparación de una curva estándar, determinando cantidades desconocidas por comparación con la curva estándar.
- Comparando las mediciones de punto final, el uso de valores de Ct también expanden el rango dinámico de cuantificación porque los datos son registrados en cada ciclo de PCR.
- Se ha demostrado una relación lineal entre Ct y la cantidad inicial de ADN sobre 5 órdenes de magnitud, comparados contra 1 ó 2 órdenes observados típicamente en un ensayo de punto final.
- La cuantificación en tiempo real elimina el proceso posterior de productos obtenidos por PCR.
- Se reducen los cambios observados por contaminación por acarreamiento, por lo tanto, remueve el procesamiento post PCR como una fuente potencial de error.
- Los valores de Ct son menos sensibles que los valores de punto final a los efectos de los inhibidores de PCR, otra vez porque las mediciones son en la fase exponencial donde los componentes de la reacción no son limitantes.
- El análisis de múltiples blancos sobre la misma placa requiere que los juegos de oligonucleótidos usen el mismo parámetro en relación al ciclo de temperatura.
- Las sondas fluorogénicas evitan complicaciones causadas por detección de amplificación no específica.

- La amplificación del blanco y el control endógeno pueden ser realizados en el mismo tubo de reacción, porque las sondas pueden ser marcadas con colorantes reporteros diferentes, lo cual reduce el número de reacciones que necesitan realizarse y asegura que la misma cantidad de templado es útil para la amplificación del blanco y el control.
- La inclusión de un control positivo interno dentro del tubo de reacción incrementa la confiabilidad de los resultados obtenidos para la cuantificación del blanco.
- La eficiencia de la amplificación es calculada de la cinética y la cantidad inicial de los transcritos genómicos derivados de ellos, de ese modo se elimina la necesidad de validación de igualdad de la eficiencia de la amplificación de los genes de referencia y blancos.

Los primeros ciclos de PCR se caracterizan por un incremento exponencial de la amplificación del genoma blanco. Los componentes de la reacción vienen a ser limitantes, por lo tanto, el rango de amplificación del blanco disminuye hasta que una altiplanicie es alcanzada y se presenta muy poco ó ningún incremento en el producto de la PCR.

La sensibilidad de detección en sistemas que utilizan fluorescencia, permite observar un ciclo de entrada cuando la amplificación de la PCR esta todavía en fase exponencial; esta es la razón principal por la que Ct es una medición más confiable del número de copias inicial que una medición de punto final donde se mide la cantidad de productos acumulados. Durante la fase exponencial, ninguno de los componentes de la reacción es limitante; como resultado, los valores de Ct son muy reproducibles para reacciones con el mismo número de copias iniciales; esto permite aumentar y mejorar la precisión en la cuantificación de ADN y ARN. Por otro lado, la cantidad de productos de PCR observados al final de la reacción es muy sensible a ligeras variaciones en los componentes de la reacción. Cuando las mediciones no son realizadas cuando las reacciones están bajo la fase exponencial, una ligera diferencia en un componente limitante puede tener un drástico efecto sobre la cantidad final del producto. Las diferencias entre detecciones de punto final y tiempo real son ilustradas en las Fig. 4 y 16.

Comparados con los métodos de cuantificación de punto final, la PCR en tiempo real ofrece el desarrollo de un ensayo moderno, con resultados reproducibles y amplio rango dinámico por el uso de valores de Ct. La metodología de PCR en tiempo real elimina la necesidad de

estándares competitivos en tubos con juegos de primers idénticos al blanco. Así, el proceso de crear ensayos de cuantificación es modernizado, porque ya no se requiere la construcción y caracterización de estándares. (Fig. 6) La PCR en tiempo real ahora hace la cuantificación de ARN y ADN mucho más precisa y reproducible, porque registra los valores de Ct determinados durante la fase exponencial de PCR a diferencia de las mediciones de punto final. La detección de fluorescencia durante el proceso térmico-cíclico de la metodología de PCR y/o RT-PCR en tiempo real puede realizarse en sistemas de detección de secuencias, en los cuales se requiere balancear las demandas de sensibilidad, conveniencia, precisión y costo.

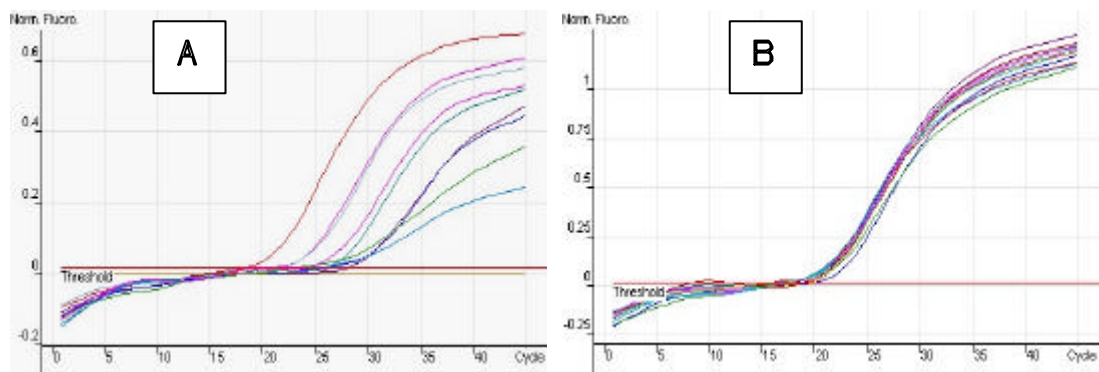


Figura 6. Comportamiento de los fluoróforos en la PCR tiempo real. La emisión de fluorescencia se observa desde los primeros ciclos de amplificación, lo que permite saber desde los primeros ciclos cual muestra es positiva y cual negativa. A. Calibradores. B. Control interno. (Tomado de programa de *Rotor-gene*).

J U S T I F I C A C I Ó N

Existe una gran necesidad de tener al alcance de toda la población un método rápido, fácil, efectivo y de costo aceptable para realizar las determinaciones de los genomas virales, debido a la influencia que esta ejerciendo el VHC en la población mundial, en el área de la salud/enfermedad y en el sector económico.

La utilización de PCR en tiempo real, tiene en principio mayor sensibilidad por ser una tecnología molecular y es un método rápido y con costos menores que otras metodologías similares. El uso de la tecnología a nivel molecular, no se restringe sólo a la capacidad de determinar si un genoma extraño existe ó no dentro de un organismo. También nos brinda la oportunidad de aportar conocimiento en relación a procesos infecciosos, la relación entre la seropositividad y la carga viral, las relaciones entre la sintomatología y las manifestaciones de la enfermedad.

Para esta situación la tecnología y la biología molecular, con la introducción de técnicas de fluorescencia a la PCR en unión con la instrumentación han formado las bases de los ensayos cinéticos ó ensayos de PCR en tiempo real, actualmente considerados como el método más sensibilidad para la detección de ARNm de poca abundancia y la herramienta más precisa capaz de amplificar, detectar y cuantificar los niveles de ARNm de forma rápida y confiable, y espero que dentro de poco tiempo esté al alcance de cualquier Institución médica y por lo tanto, de la población en general. Como el análisis por PCR no detecta anticuerpos, sino demuestra la presencia de genomas virales, las pruebas realizadas mediante esta tecnología han demostrado una reducción significativa del período de ventana diagnóstica (Ej. para VHC de 82 a 23 días).

El diagnóstico de la infección por VHC actualmente se realiza a través de pruebas de tamizaje para búsqueda de anticuerpos específicos para el virus, método que ofrece un amplio margen de error porque se ha demostrado que el período de formación de anticuerpos contra el VHC puede durar hasta 15 años. Por otra parte, se determinan anticuerpos totales contra el VHC y no por separado anticuerpos tipo IgM y/o IgG, lo cual en un momento dado nos permitiría saber si los anticuerpos en cuestión corresponden a memoria inmunológica ó infección reciente. Se sabe que la presencia de anticuerpos no

necesariamente indica enfermedad activa, pero sí una respuesta inmune al virus, ya que no todos los pacientes con anticuerpos totales específicos para el virus, presentan una actividad patológica hepática relevante.

Contar con un método rápido y de fácil manejo, para la detección temprana de la infección con VHC, ofrecería la oportunidad de impedir la replicación viral antes de que el daño al hepatocito sea irreversible, porque el virus *per se* favorece el desarrollo de procesos celulares importantes: cirrosis hepática y/o enfermedad autoinmune. Por otro lado, existe una cantidad desproporcionada de gasto sobre VHC, de 4 a 5 veces más grande que con VIH/SIDA, versus otras enfermedades.

HIPÓTESIS

Existe una alta incidencia de infecciones asintomáticas crónicas con VHC, la falta de procedimientos de tamizaje en las primeras etapas de la infección, favorecen la diseminación del virus, ya que la detección se realiza de manera general, a través de la búsqueda de anticuerpos totales específicos contra el virus causante de la hepatitis C.

La utilización de una metodología como la PCR en tiempo real, para la detección temprana de infección con VHC nos brindaría la oportunidad de impedir la replicación viral antes de que el daño a la célula sea de una forma irreversible, lo que se traduciría en menores costos en el manejo y tratamiento de los pacientes y una mejoría en su calidad de vida.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Demostrar la conveniencia de la utilización, eficacia y sensibilidad del método de PCR en tiempo real para la detección temprana de infección con VHC, antes de la formación de anticuerpos específicos.

Objetivos particulares específicos:

1. Determinar la presencia y/o ausencia del virus causante de la hepatitis C por RT-PCR en tiempo real en pacientes negativos por diagnóstico serológico.
2. Determinar cuales estaban en períodos de ventana para la formación de Acs. vs. VHC, considerando los factores de riesgo antes de la toma de muestra.
3. En los pacientes positivos a la búsqueda de anticuerpos y en la búsqueda de genomas virales, comparar la última determinación de su carga viral, realizada por una metodología de RT-PCR convencional acoplada a detección espectrofotométrica (Roche) contra la carga viral medida con la tecnología de PCR en tiempo real.

M E T O D O L O G Í A

I. MUESTRAS.

SELECCIÓN DE LA MUESTRA.

La muestra estudiada se delimitó de acuerdo a los criterios contenidos en los lineamientos siguientes:

Población estudiada:

Pacientes derechohabientes de Pensiones Civiles del Estado de Chihuahua, adscritos a la Delegación Ciudad Juárez, quienes durante los años de 2001 y 2002 fueron muestreados para la determinación de anticuerpos totales contra hepatitis C, por ser:

- a) pacientes quienes presentaron datos clínicos de hepatitis y se deseaba descartar el tipo de hepatitis que presentaban.
- b) trabajadores de la Institución con actividades de riesgo para el contagio de hepatitis C, a quienes se les practicó una determinación de anticuerpos vs. VHC como parte del programa de monitoreo de salud en el trabajo.

Criterios de inclusión de Pacientes:

1. Ser derechohabientes de Pensiones Civiles del Estado.
2. Tener una edad: entre 18 y 65 años.
3. Que se les haya practicado un examen serológico en el laboratorio clínico para búsqueda de Acs. vs. VHC durante los años 2001 y/o 2002 y que cuyo resultado haya sido negativo.
4. Haber cursado con datos clínicos de hepatitis y/o sospecha médica por historia clínica de infección con algún virus que cause hepatitis.

Criterios de exclusión de Pacientes:

1. Pacientes que no cumplieran con los requisitos anteriores.
2. Pacientes que cumplieran con los requisitos de inclusión, pero que estén diagnosticados como hemofílicos.
3. Pacientes con otra patología hepática ya comprobada y/o infectados por VIH.

Grupo control positivo:

Pacientes diagnosticados como infectados con VHC por prueba de ELISA (detección de anticuerpos totales) positiva, de los cuales se conoce el genotipo y la carga viral.

Grupo control negativo:

Muestras (10% de las muestras totales obtenidas) de niños menores de 5 años que nunca hayan recibido derivados sanguíneos, hijos de madres seronegativas y sin prácticas de riesgo.

Requisitos a cumplir:

1. Contar con una muestra mínima de 3 mL de suero por paciente, preferentemente 5 mL.
2. Contar una historia clínica de cada paciente.
3. Contar con un registro previo de los pacientes que conforman la muestra del estudio, que incluya identificación de la muestra, fecha del rastreo de Acs. vs. VHC y su resultado.

Tamaño de la muestra:

Se contó con un total de 132 muestras, las cuales se distribuyeron de la siguiente forma:

- 20 muestras correspondientes al grupo control positivo, obtenidas de pacientes de los cuales se ha confirmado por varios métodos su infección con VHC y se descartó por búsqueda de anticuerpos la coinfección con VIH.
- 12 muestras que cumplieran con los requerimientos para pertenecer al grupo control negativo, de hijos cuyas madres por serología fueron negativas a Acs. vs. VHC y VIH y que por historia clínica registrada en el expediente, no tienen factores de riesgo para adquirir la infección.
- 30 muestras de trabajadores de la salud, con actividades de riesgo para contraer la infección por VHC, con resultados negativos en rastreos previos de anticuerpos para VHC y VIH. Este grupo se denominó población de riesgo.
- 70 muestras que cumplieran con los criterios de inclusión y exclusión, de pacientes a los cuales por historia clínica se consideran población sana.

TOMA DE MUESTRAS.

Se realizó según el procedimiento escrito para ello en el manual de toma de muestras del laboratorio de análisis clínicos de PCE:

- paciente en ayunas.
- punción venosa, previo aseo con algodones con solución de iodine y/o etanol al 96%.
- en 3 tubos diferentes:
 - 1 tubo con gel, drena 5 mL de sangre total, el gel separa las células sanguíneas del suero.
 - 1 tubo sin aditivos, en el cual se deja coagular la sangre antes de la separación del suero (drena 7 mL de sangre total) .
 - 1 tubo con algún anticoagulante ya sea ACD (5mL) o EDTA (4.5 mL).

La intención de tomar muestras diferentes es observar a la hora de procesar las muestras por la PCR (tradicional y/o tiempo real) si existe diferencia en relación al tipo de muestra utilizada.

ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS.

El suero/plasma obtenido se guardó para ser utilizado posteriormente; congelado a menos 20°C en tubos de plástico, diseñados para congelar muestras desde 0°C hasta menos 70°C.

TRASLADO DE MUESTRAS.

Se enviaron a través de un servicio de mensajería aérea, empacadas en hielo seco, con lo cual se garantizó que las muestras no se descongelarán; y se evitaron problemas de aduana, independientemente de los escritos de responsabilidad de muestras que se presentaron ante las autoridades correspondientes.

II. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.

La realización del presente trabajo se fundamentó en la detección de ARN específico de virus de hepatitis C en muestras séricas a través de la metodología de PCR en tiempo real, en el equipo *Rotor-Gene TM 2000/3000* de *Corbett*. Los pasos que se siguieron se describen a continuación (Fig. 7): De la muestra recolectada se separaron dos alícuotas: una para la búsqueda de Acs. Vs. Hepatitis A, B, C y la otra se congeló a menos 20 ° C para su posterior ensayo por PCR en tiempo real. A excepción de las muestras de los pacientes que ya se habían determinado como seropositivos que se utilizaron como el control positivo del ensayo, las cuales se tomaron un día antes de la extracción del ARN. Se procesó la

alícuota para la búsqueda de Acs. contra Hepatitis A, B, C, y se llevó un registro de pacientes y sus resultados. Las muestras se procesaron en el Laboratorio Internacional de Análisis, S.A. en la ciudad de Chihuahua, un día después de la toma de muestra.

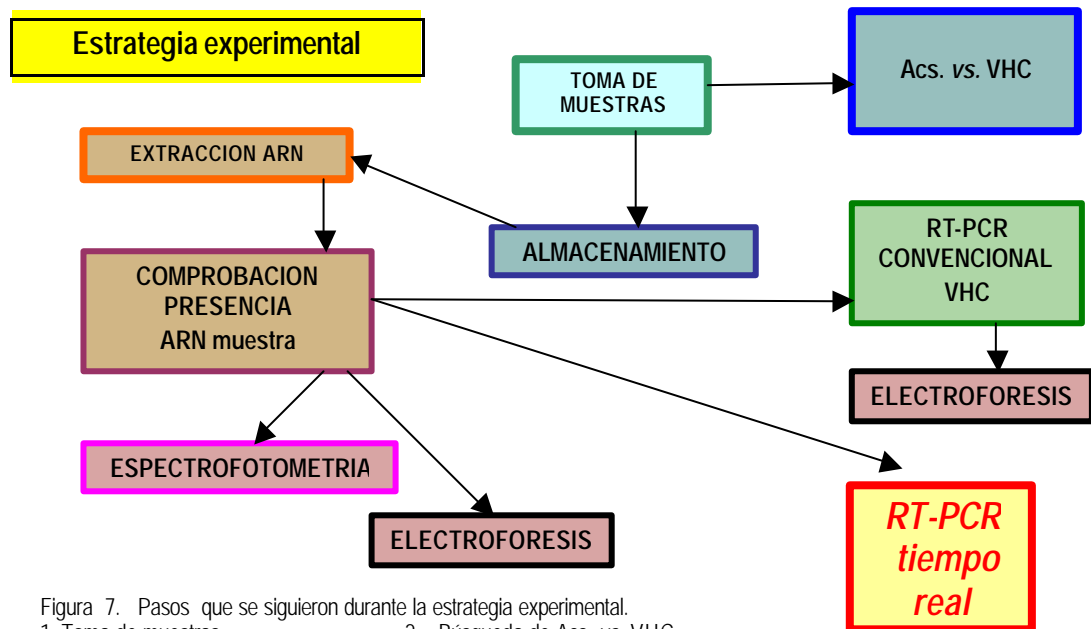


Figura 7. Pasos que se siguieron durante la estrategia experimental.
 1. Toma de muestras. 2. Búsqueda de Acs. vs. VHC.
 3. Extracción de ARN de la muestra. 4. Búsqueda de ARN viral de VHC.

En su momento, se procesaron las alícuotas congeladas para búsqueda de genomas de VHC por la metodología de PCR en tiempo real. El primer paso a seguir fue extraer/aislar el ARN total de las muestras séricas y/o plasmáticas. La extracción se realizó con un equipo de QIAgen extraction RNA minikit, para garantizar que el proceso total de extracción fuese estandarizado, esto debido a que se manejan muestras humanas. Posteriormente se procedió a verificar por espectrofotometría y electroforesis que el ARN obtenido realmente estuviera presente, fuera de buena calidad y en cantidad apropiada. Las lecturas se realizaron en dos equipos diferentes: un Espectrofotómetro Beckman modelo DU 650 (ENMH – IPN) y un Espectrofotómetro Milton Roy spectronic 601 (CINVESTAV – IPN).

El tercer paso a seguir fue correr una RT-PCR convencional de sólo algunas muestras, las cuales se seleccionaron al azar de las muestras positivas a la búsqueda de Acs vs. VHC. Se realizó con un equipo de Real Art TM HCV GEL RT PCR para la detección de ADN en geles de agarosa. El HCV GEL Master con tiene reactivos y enzimas para la amplificación

específica de una región de 237 bp del genoma de VHC, y una segunda sonda heteróloga (amplicón de 400 bp) que permite revelar la presencia de inhibidores potenciales. Con el procedimiento anterior se buscaba un resultado “referencia” de la presencia del ARN de interés.

El siguiente paso de la estrategia experimental que se siguió fué buscar la presencia de partículas virales en todas las muestras a través de la metodología de PCR en tiempo real. Se realizó en un equipo ROTOR-GENE, equipo automatizado para la medición de copias genómicas en este caso de VHC, localizado en el laboratorio Juárez en la ciudad de Oaxaca, Oax. De los resultados obtenidos en los experimentos anteriores y con la información registrada en el expediente clínico, se hizo una correlación de la cual obtuvimos nuestros resultados, algunos esperados otros inesperados.

AISLAMIENTO DEL ARN.

La extracción y purificación del ARN de la muestra se realizó con un equipo de QIAGEN, [QIAamp viral RNA minikit – Cat. No. 52906] según el método descrito; el uso de un equipo con una metodología estandarizada y validada nos aporta mayor rapidez y seguridad al manejar la muestra.

Principio: El estuche combina las propiedades de unión selectiva de una membrana de silica gel con la velocidad de una microcentrífuga y/o la técnica de vacío y es idealmente adecuado para el procesamiento simultáneo de muestras múltiples. Inicialmente la muestra es lisada bajo condiciones altamente desnaturalizantes, para inactivar las RNasas y para asegurar el aislamiento del ARN viral intacto. Las soluciones amortiguadoras se ajustan para proveer una unión óptima del ARN a la membrana de QIAamp, y que la muestra sea cargada dentro de la columna. El ARN se une a la membrana y los contaminantes son lavados eficientemente a través de 2 pasos utilizando 2 buffers de lavado diferentes. Un ARN de alta calidad es obtenido por elusión en un buffer especial libre de RNasas, listo para su uso directo ó su almacenamiento seguro. El ARN purificado se encuentra libre de proteínas, nucleasas y otros contaminantes e inhibidores. La membrana de QIAamp garantiza la recuperación extremadamente alta de ARN puro e intacto en sólo 20 minutos sin el uso de fenol/cloroformo, y la extracción ó precipitación con alcohol. El ARN puede ser purificado por este sistema de plasma (con anticoagulantes diferentes a heparina), suero y

otros líquidos corporales libres de células. Las muestras utilizadas pueden ser frescas ó congeladas, pero sí son congeladas solo se pueden descongelar una vez, ciclos repetidos de congelamiento/descongelamiento de muestras podrían: 1. reducir los títulos virales y modificar una óptima sensibilidad, 2. favorecer la aparición de acumulos de crioprecipitados, que obstaculizan las membranas cuando se utiliza el protocolo de vacío. QIAamp viral RNA mini kit puede ser utilizado para el aislamiento de ARN viral de una amplia variedad de virus incluyendo VHI, VHA, VHC, VHD, Enterovirus, pero su acción no puede ser garantizada para todos los virus.

Volumen de muestra: Las columnas del QIAamp spin pueden unir ARN mayor a 200 nucleótidos de largo. La utilidad del este método de extracción podría depender del tamaño y el almacenamiento de la muestra y del título viral.

a) Lisis de la muestra:

La muestra primero se desnaturaliza con una solución de AVL, la cual al mismo tiempo que lisa los restos celulares contenidos en la muestra, inactiva y/ó inhibe la acción de las RNAasas, por lo tanto, limita la degradación del ARN por RNAsas residuales y asegurar el aislamiento del ARN viral intacto. La solución de AVL contiene además un acarreador el cual favorece la unión del ARN liberado de la muestra a la membrana de la columna de afinidad durante la separación, especialmente en el caso de muestras con títulos bajos. Así mismo el acarreador también limita la posible degradación del ARN viral debida a cualquier actividad de RNasa.

b) Procedimiento de purificación y/o separación del ARN:

Se lleva a cabo en 3 pasos utilizando QIAamp columnas de centrifugado, en una microcentrifuga estándar que alcance hasta 14 000 r.p.m. y/ó con un equipo de vacío múltiple. Ambos procedimientos (centrifugado ó vacío) esta diseñados para garantizar que no haya contaminación cruzada de muestra a muestra y permiten un manejo seguro de muestras potencialmente infecciosas. Las columnas de QIAamp se ajustan a la mayoría de los tubos estándar para microcentrifuga; se requieren tubos colectores de 2 mL como soporte de las columnas de centrifugado de QIAamp durante los pasos de cargado y lavado. El ARN eluído puede ser recolectado en tubos de 1.5 mL libres de RNAsas.

- Absorción a la membrana de QIAamp.-

La muestra obtenida en el paso anterior se homogeniza perfectamente y se toma una alícuota, la cual se hace pasar a través de una columna de afinidad. Las condiciones

amortiguadoras del lisado están ajustadas para proveer condiciones óptimas de unión para el ARN viral antes de cargar la muestra dentro de la columna de centrifugado QIAamp. El ARN viral es adsorbido sobre la membrana de sílica gel de la columna durante 2 pasos breves de centrifugación. La unión del complejo ARN-acarreador a la membrana de la columna depende de la concentración de sal y del pH en el lisado que aseguran que las proteínas y otros contaminantes los cuales pueden inhibir las reacciones enzimáticas río abajo, no sean retenidos sobre la membrana. Este método de purificación del ARN a través de una columna de afinidad evita la contaminación cruzada de una muestra a otra y disminuye el de muestras infecciosas.

- Remoción de contaminantes residuales.-

El ARN viral unido a la membrana, es lavado libre de contaminantes durante 2 pasos cortos de centrifugación. El uso de 2 soluciones buffer diferentes, AW1 y AW2, las cuales contienen etanol con una concentración de 96-100% de pureza, tiene un aumento significativo de la pureza del ARN eluido. Las condiciones de lavado garantizan la remoción completa de cualquier contaminante residual sin afectar la unión del ARN a la columna.

- Elución con buffer AVE.-

El buffer AVE es agua libre de RNasas que contiene 0.04% de azida de sodio para prevenir el crecimiento microbiano y la contaminación subsecuente con RNasas. La azida de sodio afecta la absorbancia espectrofotométrica en lecturas entre 220 y 280 nm, pero no tiene efecto sobre las aplicaciones río abajo, tales como la RT-PCR. Se puede determinar la pureza del ARN eluido, haciendo la elución con agua libre de RNasas en lugar el buffer AVE. El resultado de la separación del ARN es una solución acuosa.

- Determinación del rendimiento – beneficio de la extracción.-

El rendimiento de ARN viral aislado de muestras biológicas es normalmente menos de 1 µg y esto dificulta su determinación fotométrica. Se debe mantener en mente que el acarreador de ARN corresponde a 5.6 µg por cada 140 µL de muestra, el cual puede parecer como la mayoría del ARN presente. Se recomienda la cuantificación por RT-PCR para la determinación del ARN viral obtenido durante el procedimiento de extracción y purificación.

- Determinación del tamaño del ARN viral.-

El tamaño y la distribución del ARN viral purificado utilizando columnas de centrifugación QIAamp puede ser verificado por desnaturalización en electroforesis en gel de agarosa, seguida por hibridización con una sonda marcada virus específico y autoradiografía.

ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO.

Objetivo: Se sabe que la absorbancia del ARN extraído a 260 nm es directamente proporcional a la concentración del ARN en una muestra.

Procedimiento:

Se realizó una dilución de 1:250 del ARN extraído en el punto anterior, pipeteando 996 μL de agua DEPC y 4 μL de la solución acuosa de ARN. La dilución anterior se homogenizó en vortex por 15 segundos. La lectura se realizó en un espectrofotómetro utilizando como blanco agua DEPC. Se realizaron las lecturas en dos espectrofotómetros: Beckman modelo DU 650 y Milton Roy Spectronic 601. Para realizar la lectura se utilizaron cubetas lavadas previamente con una solución de SDS (docecyl sulfato de sodio) al 10%, que garantiza la eliminación de residuos contaminantes y enjuagadas primero con agua destilada y luego con agua DEPC. Las lecturas se realizaron a 260 y 280 nm, lo que nos permitió calcular la relación de las absorbancias de 260/280 la cual nos refleja la calidad del ARN extraído.

Agua DEPC: La solución de Agua DEPC se preparó mezclando 1 mL de dietilpirocarbonato (inhibidor de RNAasas) en 1000 mL de agua destilada, la solución anterior se dejó sobre un agitador magnético mezclándose por 24 horas antes de utilizarse.

Cálculos:

Para el cálculo de la concentración de ARN a partir del análisis espectrofotométrico se utiliza la siguiente fórmula:

$$(\text{Absorbancia } 260 \text{ nm}) (\text{Dilución de ARN eluido} + \text{agua DEPC} = 1:250) (\text{Factor} = 33) = \text{ng}/\mu\text{L ARN}$$

Para transformar $\text{ng}/\mu\text{L}$ en $\mu\text{g}/\text{L}$, unidades de nuestro interés utilizamos la fórmula:

Si 1000 ng/L están en 1 microlitro, en 148 ng/L de muestra, cuantos habrá,

- relación es inversa, porque se trata de concentraciones, en este ejemplo el resultado sería: $1\ 000 \text{ entre } 148 = 6.7567$ que se redondea a 7 microlitros.

Este cálculo es la base para determinar la cantidad de muestra del ARN extraído y que se utilizará para el corrimiento de la electroforesis.

Se leyeron las absorbancias de todas las muestras extraídas, pero enfrentamos un problema el último paso de la extracción se realizó con una solución que contiene azida de sodio, lo

cual afecta la lectura de la absorbancia entre 220 y 280 nm. Este problema se solucionó de la siguiente forma: se realizaron las lecturas y se hizo el cálculo aproximado de la concentración del ARN en ng/ μ L de muestra lo cual nos sirvió de referencia para saber que la extracción fue verdadera lo que se traduce en que sí se obtuvo ARN de la muestra.

ANÁLISIS ELECTROFORÉTICO.

Selección de muestras:

Se realizó en base la cantidad de ARN extraído de cada muestra, según la absorbancia obtenida a 260 nm (ver párrafo anterior).

Reactivos utilizados:

Gel de agarosa: se pesaron 0.6 g de agarosa en un recipiente estéril, los cuales se disolvieron en 43.5 mL de agua DEPC y se fundieron en horno de microondas, para luego dejarlo enfriar a 60°C. El siguiente paso fue mezclar y verter rápidamente sobre el molde el agar para hacer el gel y se dejó solidificar a temperatura ambiente, ya con el peine insertado para que al solidificar quedarán los espacios para vaciar las muestras. Al final se agregaron 5 mL de solución MOPS 10x y 1.5 mL de formaldehído (pH = 6.0) al 37% en la cámara de extracción.

Agua DEPC: Debido a la toxicidad del dietilpírocarbonato (DEPC), preparar en campana de seguridad utilizando dobles guantes o gruesos y bata. Se agregan 100 μ L de DEPC por cada 100 mL de agua destilada/deionizada, después de mezclar se agita vigorosamente hasta formar una solución homogénea, que se deja en movimiento constante por 24 horas con un agitador magnético. Se recomienda esterilizar en autoclave para eliminar el DEPC que es un inhibidor de RNasas.

Solución MOPS 10 X: Se preparó con la siguiente fórmula:

REACTIVO	CANTIDAD	CONCENTRACION
MOPS	41.84 g	0.4 M
ACETATO DE SODIO TRIHIDRATADO	6.8 g	0.1 M
EDTA	0.93 g	10 nM

Mezclar y ajustar el pH a 7.2 con NaOH y se almacena a temperatura ambiente.

Preparación de la cámara de electroforesis: Se lava con "sigma clean" y se enjuaga con agua DEPC. Dejar la cámara de electroforesis en agua DEPC al 3% por 1 hora junto con el carro y el peine, al final enjuagar nuevamente con agua DEPC.

Preparación de la muestra:

MUESTRA	REACTIVOS	MARCADOR DE PESOS
5 μL	MOPS 10 X	5 μL
8.75 μL	Formaldehído 37%	8.75 μL
25 μL	Formamida	25 μL
9.25 μL	Agua DEPC	6.25 μL
2 μL	RNA total (aprox. 10 $\mu\text{gr/muestra}$)	
----	RNA ladder	5 μL
50 μL	Volumen total	50 μL

Mezclar y calentar a 55°C por 15 minutos. Después poner en hielo por 3 minutos y por ultimo añadir 5 μL de amortiguador de carga y 2 μL de bromuro de etidio.

Procedimiento:

- De las muestras seleccionadas para la electroforesis se cargaron los pozos del gel con las muestras ya preparadas y a una concentración de $\pm 1 \mu\text{g}$ de muestra, por lo tanto, se tomaron de cada muestra volúmenes diferentes que representarían alrededor de un $1 \mu\text{g}$ de muestra – haciendo la siguiente consideración:
 - 1 μg = 1000 ng y las muestras están calculadas en ng – por lo tanto, sí
 - 1 microlitro-----tiene 1000 ng, cuántos microlitros tengo en 148 ng de muestra.
 - Se consideró que la suma del volumen de agua DEPC utilizada en la preparación de la muestra y la suma del volumen de muestra debe ser de 11.25 microlitros. Ver la tabla de la preparación de la muestra.
- Se acomoda el gel en la cámara de electroforesis y se cubre con MOPS 1x, para luego conectar la cámara a la fuente de poder con una corriente de 40 volts por cm.
- Pasado el tiempo determinado para la electroforesis (no más de 30 minutos – porque el corrimiento electroforético se puede salir del gel) se desconecta la cámara.
- Sacar la base del gel de la cámara y lavar con SSC 10x, 3 veces dejando remojar el gel por 15 minutos en cada ocasión
- Transferir el gel con SSC 10x.
- El corrimiento electroforetico se hace visible en un documentador de imágenes, en este caso se utilizó un equipo EPI-Chemi darkroom de UVP Laboratory products, con las siguientes especificaciones de lectura: light overhead - 254 nm Always - on.

RT - PCR CONVENCIONAL – TRADICIONAL.

Se realizó con un equipo de Real Art TM HCV GEL RT PCR para la detección de DNA en geles de agarosa; un sistema de fácil manejo, que utiliza un PCR termociclador, seguido por la detección del producto de la PCR en un gel de agarosa. El HCV GEL Master contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de una región de 237 bp del genoma de HCV. En orden a revelar una inhibición potencial de la PCR el HCV GEL Master también contiene una segunda heteróloga (amplicón de 400 bp).

Fundamento del método: Crear un cADN que sirva de molde para la producción de nuevas copias virales, en base a la utilización de cambios de temperatura específicos que sirven para separar las hebras originales (ARN viral + cADN), para alinear y pegar los iniciadores de las cadenas genómicas por formar, para que actúe la polimerasa y forme los nuevos genomas. El HCVGEL Master contiene reactivos y enzimas para la específica amplificación de una región de 237 bp del genoma de VHC y además contiene una segunda sonda de 400 bp (amplicón) que permite revelar los inhibidores potenciales para la PCR que contenga la muestra.

Objetivo:

- a) de la RT = transcriptasa inversa: crear un cDNA (ADN copia) que sirva de molde para la producción de ARN virales en este caso de HCV.
- b) de la PCR = reacción en cadena de la polimerasa: amplificar el número de genomas virales, para poder hacerlos visibles por otro método adyacente.

Reactivos y equipo utilizados:

- Buffer de electroforesis TAE o TBE
- Buffer de carga de ADN
- Bromuro de etidio para la visualización del ADN
- Cámara de electroforesis para gel de agarosa
- Fuente de poder: (voltímetro – BIORAD)
- Transiluminador UV: EPI-ChemiDarkroom, de UVP Laboratory products.

Precauciones generales: Utilizar pipetas con filtros y trabajar rápidamente sobre hielo ó en un bloque frío. Al descongelar se mezclar los componentes y centrifugar brevemente. Almacenar el material positivo (muestras, controles y amplicones separados de otros reactivos). Añadir muestras, reactivos y controles a la mezcla de reacción en áreas separadas.

Procedimiento:

a) Preparación de la muestra: Como las muestras de interés en este trabajo fueron sueros y/o plasmas, y no en todos los casos se sabía si había presencia de genomas virales de VHC en las mismas, primero se procedió a extraer el ARN presente en la muestra (ver procedimiento de extracción y purificación del ARN en párrafos anteriores). Se recomienda en el caso de que la extracción del ARN no lleve un acarreador de ADN/ARN agregarlo (ARN homopolímero de poli(A)) a una concentración de 10 µgr por cada mL de buffer de lisis a la mezcla de buffer de lisis-muestra; esto es recomendado para la extracción de ácidos nucleicos de fluidos corporales libres de células donde el contenido de ADN/ARN es bajo. Cuando se tienen protocolos donde el buffer de elusión contenga etanol, se añade un paso adicional de centrifugación antes de la elusión para remover cualquier remanente de etanol. Esto previene una posible inhibición de de la PCR. El estuche de reactivos RealArt™ HCV GEL RT PCR no puede ser utilizado con métodos de aislamiento de ácidos nucleicos que utilicen fenol.

b) Preparación de la PCR: Se recomienda el uso de tubos para PCR de paredes delgadas para todos los pasos de la amplificación. Incluir obligatoriamente en cada corrida de PCR por lo menos un control positivo y un control negativo (agua grado PCR). Antes de cada uso todos los reactivos requieren ser descongelados y homogenizados completamente mezclando por pipeteo de sube y baja o por acción del vortex muy rápidamente para luego centrifugarse brevemente.

	Número de muestras	
Esquema de pipeteo:		
Preparación	HCV GEL Master	45 µL
Del	Muestra (RNA eluido)	5 µL
Ensayo de PCR	Volumen total	50 µL

Cerrar el tubo y centrifugar 10 segundos a 400xg (2000rpm). Si se utiliza un termociclador sin tapadera caliente, deberá cubrirse cada mezcla de reacción después de centrifugación con una gota de aceite mineral y volver a cerrar el tubo de reacción.

c) Programación del termociclador:

PASO	PARÁMETRO	VALOR
1. Transcripción en reversa	Ciclos	1
	Temperatura blanco	50° C
	Tiempo de Incubación	30 min
2. Activación inicial de la "Hot Start Enzyme"	Ciclos	1
	Temperatura blanco	94° C
	Tiempo de Intubación	5 min
3. Amplificación del cDNA	Ciclos	8
	Segmento	1 2 3
	Temperatura blanco	94°C 58°C 72°C
	Tiempo de Incubación	30 seg 30 seg 45 seg
	Ciclos	1
4. Elongación terminal	Temperatura blanco	72° C
	Tiempo de incubación	10 min

d) **Resultados:** Los resultados de la RT-PCR se hicieron visibles en el corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2%, lo que se observo es un ADN complementario al genoma (ARN) del virus de hepatitis C. El voltaje utilizado es 70 volts y el tiempo de corrimiento fueron 10 min.

Tabla de preparación de muestra para el corrimiento electroforetico después de la RT-PCR convencional:

# muestra	[ng/dL] [abs 260nm]	[eqv. en µg / L]	Agua DEPC(µL)
2	321	3.11 ? 3.11 **** solo 3	8.1
8	198	5.05 ? 5	6.5****
14	536	1.86 ? 2	9.25
15	387	2.58 ? 3	8.25
17	214	4.67 ? 5	6.25
24	470	2.127 ? 2	9.25
25	437	2.288 ? 2.3	9
35	214	4.673 ? 5	6.25
36	148	6.756 ? 7	4.25

Nota: la sumatoria de los volúmenes de muestra y agua DEPC = 11.25 µL

RT- PCR EN TIEMPO REAL.

Se realizó con el estuche de reactivos de Real Art™ HCV RG RT-PCR Reagents, diseñado para la detección y cuantificación de copias de genomas –ADNc- a través de la medición de la emisión de fluorescencia en el equipo *Rotor-Gene™ 2000/3000* de *Corbett*.

Fundamento del método: Permitir la formación de un c-ADN, la amplificación de el genoma en estudio por medio de iniciadores específicos, la detección de inhibidores potenciales de la PCR en cada muestra por la inclusión de una sonda que actúa como control interno y facilitar la lectura de los resultados de la amplificación, todo lo anterior a través de la utilización de sondas fluorogénicas diferentes para calibradores, control interno y cada una de las muestras.

Objetivo: Detectar, amplificar por PCR, y cuantificar, en el mismo tubo de reacción y en un sólo paso, a partir de un ARN muestra y/o control y/o calibrador, los genomas para los cuales se utilizan iniciadores específicos y traducir las lecturas de la emisión de fluorescencia en proporción a la cantidad de muestra inicial.

Reactivos y equipo utilizados:

- HCV RG Master que contiene:
 - La transcriptasa inversa, necesaria para la elaboración del cADN.
 - ADN polimerasa, que amplifica la secuencia de 240 bp del VHC.
 - 2 oligonucleótidos (sentido y antisentido) que actúan como primers o iniciadores.
 - dNTP's o desoxinucleótidos, necesarios para la formación de las nuevas hebras durante la polimerización.
- HCV RG IC: que tiene la función de control interno y que verifica en cada muestra la presencia de inhibidores.
- Sondas fluorogénicas: 1 azul para el Master, 1 blanca para el agua grado PCR ó control negativo, 1 verde ó sonda JOE que es el control interno, 4 rojas para cada uno de los diferentes valores de los calibradores y la sondas para cada muestra.
- Equipo utilizado: *Rotor-Gene™ 2000/3000* de *Corbett*

Precauciones generales: Son las mismas que para cualquier metodología de biología molecular: utilizar guantes libres de talco, usar pipetas con filtros y trabajar rápidamente sobre hielo o en un bloque frío; al descongelar mezclar los componentes en vortex y centrifugarlos brevemente para homogenizar; almacenar el material positivo, muestras,

controles y amplicones separados de otros reactivos, para evitar contaminaciones por manejo de los mismos. Añadir los componentes a la mezcla de reacción en áreas separadas y protegidas, incluso utilizar juegos de pipetas diferentes, para evitar contaminación.

Procedimiento:

a) Preparación de la muestra: primero se procedió a extraer el ARN presente en la muestra (ver procedimiento de extracción y purificación del ARN en párrafos anteriores). Remover los remanentes de etanol por centrifugación, para prevenir una posible inhibición de la PCR.

b) Preparación de la PCR: Se recomienda el uso de tubos para PCR de paredes delgadas para todos los pasos de la amplificación. Incluir obligatoriamente en cada corrida de PCR los cuatro calibradores y un control negativo (agua grado PCR). Antes de cada uso todos los reactivos y las muestras que van a ser utilizadas requieren estar perfectamente descongelados y homogenizados, ya sea por pipeteo de sube y baja o por acción del vortex para luego centrifugarse brevemente. La preparación de las muestras se realizó en 3 espacios perfectamente protegidos y separados, cada uno con un juego de pipetas de uso exclusivo para la acción realizada, uno para la inoculación de muestras, otro para los calibradores y uno más para los blancos y/o controles negativos.

Esquema de pipeteo: El volumen total da una sumatoria de 50 µL, y está constituido por 15 µL de HCV RG Master; 5 µL de muestra, equivalentes a ARN eluido; y 0.5 µL de HCB RG IC. Cerrar el tubo y centrifugar 10 segundos a 400xg (2000rpm). Montar blanco, calibradores y muestras en el equipo.

c) Programación del termociclador:

PASO	PARÁMETRO	VALOR		
1. Transcripción en reversa	Ciclos	1		
	Temperatura blanco	50° C		
	Tiempo de Incubación	600 seg		
2. Activación inicial de la "Hot Start Enzyme"	Ciclos	1		
	Temperatura blanco	95° C		
	Tiempo de Incubación	50 seg		
3. Amplificación del cDNA	Ciclos	8		
	Segmento	1	2	3
	Temperatura blanco	95°C	55°C	72°C
	Tiempo de Incubación	8 seg	20 seg	20 seg
4. Elongación terminal	Ciclos	1		
	Temperatura blanco	72° C		
	Tiempo de incubación	10 min		

d) Resultados: Los resultados de la RT-PCR en tiempo real se observan de manera directa en el equipo, ofreciendo una ventaja metodológica ya que en menos tiempo y sin manipulación de la muestra posterior a la PCR, se obtienen ausencia y/o presencia de genomas virales y al mismo tiempo la cuantificación de los mismos debido a que el método incorpora el uso de sondas fluorogénicas y que la emisión de fluorescencia se realiza, se visualiza y cuantifica desde el inicio de la fase exponencial de la curva de amplificación. Es conveniente comparar los patrones a seguir en ambas metodologías de PCR, la convencional y la de tiempo real; como se puede observar la diferencia en las temperaturas no es significativa, donde la diferencia es muy significativa es en los tiempos de proceso y desde luego en la forma de tomar las lecturas. Ver Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Parámetros utilizados en la RT-PCR convencional.

Acción	# Ciclos	Temperatura	Tiempo
1. Transcripción en reversa	1	50° C	30 min
2. Activación inicial de la "Hot Start Enzyme"	1	94° C	5 min
3. Amplificación del cDNA	8	Segmento 1 94°C	30 seg
		Segmento 2 58°C	30 seg
		Segmento 3 72°C	45 seg
4. Elongación terminal	1	72° C	10 min

Resumen de los parámetros utilizados para el corrimiento de la RT-PCR convencional. Se remarcen las temperaturas y los tiempos utilizados, para ser comparados con la RT-PCR en tiempo real.

Tabla 2. Parámetros utilizados en la RT-PCR tiempo real.

Acción	# Ciclos	Temperatura	Tiempo
1. Transcripción en reversa	1	50° C	600 seg
2. Activación inicial de la "Hot Start Enzyme"	1	95° C	50 seg
3. Amplificación del cDNA	8	Segmento 1 95°C	8 seg
		Segmento 2 55°C	20 seg
		Segmento 3 72°C	20 seg
4. Elongación terminal	1	72° C	10 min

Resumen de los parámetros utilizados para el corrimiento de la RT-PCR en tiempo real. Se remarcen las temperaturas y los tiempos utilizados, para ser comparados con la RT-PCR convencional.

RESULTADOS

1. Características clínicas de los pacientes.

Al analizar los resultados obtenidos con la información clínica obtuvimos lo siguiente: Las muestras del grupo control positivo presentaron 6 genotipos diferentes – 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 3b – siendo los más representativos el 1b y el 2b. Las vías de contagio más frecuentes fueron: la transfusión de derivados sanguíneos en 7 de los 16 casos, los cuales corresponden a un 44%; seguida por el uso/abuso de drogas en 4 de los 16 casos, lo que corresponde a un 25% de los casos, seguidos por contacto sexual con un 18.5% de los casos, como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Relación entre la vía de contagio y el genotipo viral.

Genotipo viral	Cantidad	Transfusiones	Drogadicción	Via sexual	Tatuajes
1a	2	1		1*	
1b	7	3	1*	3*	1
2a	1				1
2b	4	3	1*	1*	
3a	1		1		
3b	1	1*	1*		
6	16	7 = 44%	4 = 25%	3 = 18.5%	2=12.5%

Se puede observar que la transfusión sanguínea sigue siendo la mayor vía de contagio para infección con VHC, seguida por la drogadicción, en el caso de contagio por vía sexual estaría en discusión ya que en solo uno de los casos sería el único factor de riesgo, en los otros hay riesgo doble como lo son transfusiones y drogadicción; en relación al riesgo en la aplicación de tatuajes, parece disminuir probablemente por la mentalidad de la población estudiada. La variación de los genotipos observados presenta un pico en el 1b, cumpliendo con el patrón nacional donde la mayoría de los infectados lo presentan. Es de llamar la atención que en el caso de tatuajes el genotipo sea uno, información que se puede ver sesgada por el número de muestras; y casos de drogadicción los genotipos sean 3 a y b.

Definitivamente una de las razones por las cuales se ha estudiado al virus causante de la hepatitis tipo C, es por las consecuencias que presenta la infección, resaltando en estos casos las alteraciones hematológicas, las lesiones hepáticas y la alteración de la función inmune; patologías que se complican cada vez más hasta llevar a la muerte al infectado y

que van en aumento conforme avanza el tiempo de la infección en un paciente, como se observa en la Tabla 4. Desde otro punto de vista, es alentador observar que no todos los pacientes infectados presentan daño colateral. Aquí resaltamos la oportunidad y la necesidad de investigar el status del sistema inmunológico de cada uno de los pacientes. Otra observación es la del efecto del tratamiento con interferón en combinación con ribavirina, sobre la replicación viral, donde los resultados obtenidos coinciden con los

Tabla 4. Tiempo transcurrido entre la sospecha de infección por Hepatitis viral y la detección con anticuerpos y PCR positiva.

Tiempo en años	Alteraciones *** Hematológicas	Lesión ** Hepática	Alteración de la * Función Inmune
3		+	
3			+
5	+		
5	+		+
8	+	+	+
12	+	+	
13	+	+	

Se observa que entre mayor es el tiempo que transcurre desde que el Médico sospecha de infección por algún virus hepático y la detección en laboratorio de la presencia del mismo, mayores son los daños en el organismo infectado. Aquí no hay que perder de vista que la formación de anticuerpos es por demás caprichosa y en el caso de infección por VHC aun más.

* = autoanticuerpos para tiroides y problemas reumatológicos autoinmunes.

** = cirrosis, fibrosis, esteatosis, hemacromatosis, Barret, sangrados.

*** = plaquetopenia, leucopenia, tiempos de coagulación alargados.

reportes bibliográficos, donde se marca una mayor tendencia a la acción de rebote, donde nuevamente se presenta la replicación viral, después de suspender el tratamiento y sólo pocos pacientes, cerca alrededor del 20% presentan un efecto sostenido al tratamiento. Ver Tabla 5.

Tabla 5. Efecto del Tratamiento con INF + Ribavirina sobre [ARN viral]

Tipo de pacientes	Número	Porcentaje
Total de pacientes VHC (+)	20	100 %
Pacientes ? carga viral post- Tx	16	80 %
Pacientes con rebote después de suspender el Tx	12	60 %
Pacientes con efecto sostenido al Tx	4	20 %
Pacientes sin Tx y ? del ARN viral	3	15 %
Pacientes sin Tx y ? del ARN viral	1	5 %

En muestras de pacientes infectados. Se puede observar que el tratamiento no tiene el mismo efecto sobre el número de copias virales en todos los pacientes, más bien estas disminuyen dependiendo del genotipo viral del que se trate y de la respuesta inmune de cada paciente. El efecto del Tratamiento

sobre la replicación viral es impredecible, pero se busca disminuir el daño a los hepatocitos y la aparición de trastornos autoinmunes.

2. Detección de anticuerpos anti-VHC por ELISA:

La búsqueda también denominada rastreo de anticuerpos totales contra virus de hepatitis C se realizó por el método de ELISA (Abbott), el cual reporta una sensibilidad del 99.9% y una especificidad de 99.9%. Se analizaron 132 muestras de las cuales 20 fueron positivas, por el método de ELISA (grupo control positivo) y el resto de las muestras fueron negativas al momento de la toma de muestra para la realización del estudio serológico contra VHC. Ver Tabla 6.

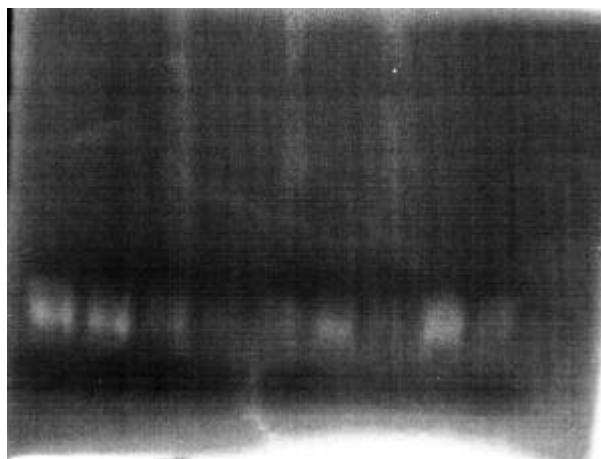
Tabla 6. Rastreo de Anticuerpos anti-VHC.

MUESTRAS		RESULTADOS	
TIPO	CANTIDAD	POSITIVOS	NEGATIVOS
Control negativo	12	0	12
Control positivo = enfermos	20	20	0
Población de riesgo	30	0	30
Población "sana"	70	0	70
TOTALES	132	20	112

Se procesaron 132 muestras, incluidas las muestras pertenecientes a los grupos control positivo y negativo, de las cuales solo las pertenecientes al grupo control positivo arrojaron resultados positivos a la búsqueda de anticuerpos específicos anti VHC, el resto de las muestras incluidas las muestras de la población de riesgo de infección y las pertenecientes al grupo de población sana arrojaron resultados negativos.

3. Extracción de ARN de las muestras:

El ARN de las muestras fué extraído utilizando 50 µL de las muestras congeladas pertenecientes a los pacientes de los distintos grupos. Durante el proceso de extracción de



ARN ribosomal

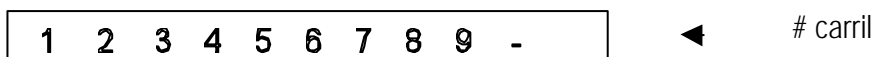


Figura 8. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa, después del proceso de extracción y purificación. Verificación de la presencia de ARN en las muestras, después de la extracción y purificación. El ARN de las muestras se observa como un barrido difuso a lo largo del carril y en la parte inferior del mismo se observa la banda correspondiente al ARN ribosomal. El barrido difuso es porque las muestras no contenían células por lo tanto la cantidad de ARN ribosomal contenido en ellas era mínimo.

ARN de la muestra, independientemente del método utilizado se tenían tres variables a controlar: el tamaño y el tiempo de almacenamiento de las muestras y el título viral de la muestra. El volumen total obtenido al final de extracción del ARN fué de 50 μ L, el cual también se congeló para su posterior manejo.

La verificación de la calidad del ARN que se extrajo se realizaría por análisis espectrofométrico, sin embargo, el método utilizado para la extracción del ARN, emplea azida de sodio, compuesto que afecta la absorbancia del eluido entre 220 y 280 nm y por lo tanto no permite la verificación espectrofotométrica de la calidad del ARN obtenido durante la extracción; pero sí permite la medición de la absorbancia de las muestras y el posterior cálculo de concentración de ARN aislado. Por lo tanto, el cálculo de la concentración de ARN total aislado de las muestras se realizó mediante la siguiente fórmula:

Si, 1 unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 44.19 μ g de ARN en la muestra
 Entonces, $[\text{RNA } \mu\text{g /mL}] = (\text{absorbancia } 260 \text{ nm}) (\text{factor de dilución}) (44.19 \mu\text{g})$

Los resultados del análisis espectrofométrico del ARN extraído y purificado de cada una de las muestras se anexan en el apéndice No. 1.

Otra herramienta utilizada para verificar la calidad del ARN obtenido por extracción de la muestra sérica o plasmática, fué el corrimiento electroforético del eluido; se realizaron dos tipos de corrimientos electroforéticos: el primero después del procedimiento de extracción y el segundo después de la amplificación por RT-PCR convencional. En este apartado sólo se manejan los resultados del primer corrimiento, como se observa en la Fig. 8. El ARN se puede observar como un barrido difuso a lo largo del carril. En la parte inferior se observa la banda correspondiente al ARN ribosomal. Por lo que el análisis electroforético nos arrojó como resultado la presencia de ARN de buena calidad en las muestras analizadas. Es importante resaltar que la cantidad de ARN extraído de las muestras fué bueno y que no se pudo determinar la calidad por la presencia de azida de sodio durante la extracción.

4. Amplificación por RT-PCR convencional.

Los resultados de la RT-PCR convencional se hicieron visibles a través del manejo posterior de la muestra amplificada, por un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 2%, donde las bandas que se observan corresponden a ADN complementario (ADNc) de aproximadamente de 237 pares de bases, como puede observarse en la Fig. 9.

En los corrimientos electroforéticos posteriores a la realización de la RT-PCR convencional se incluyó obligatoriamente en cada corrida por lo menos un control positivo y un control negativo, en estos últimos se agregaron al azar muestras pertenecientes al grupo control negativo. En este caso sólo se procesaron por RT-PCR convencional las muestras positivas por anticuerpos, consideradas como grupo control positivo, ya que el interés era saber si el método de extracción fué exitoso.

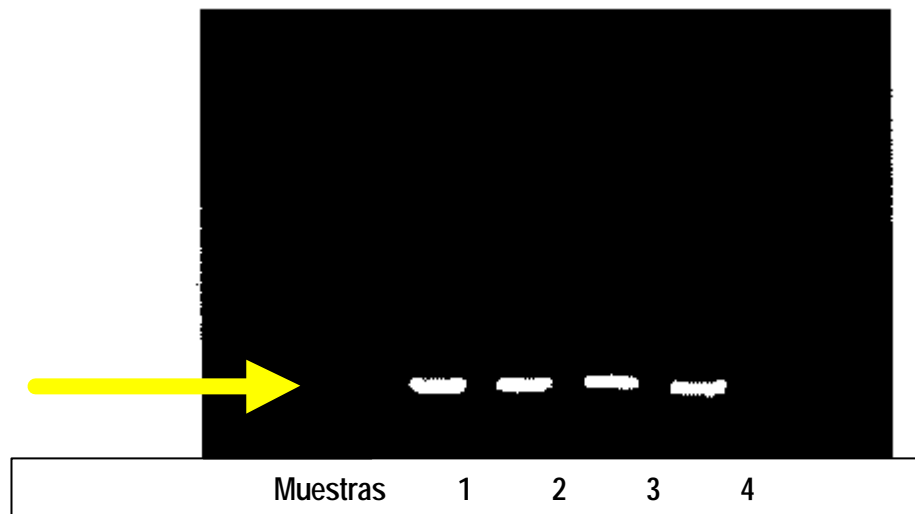
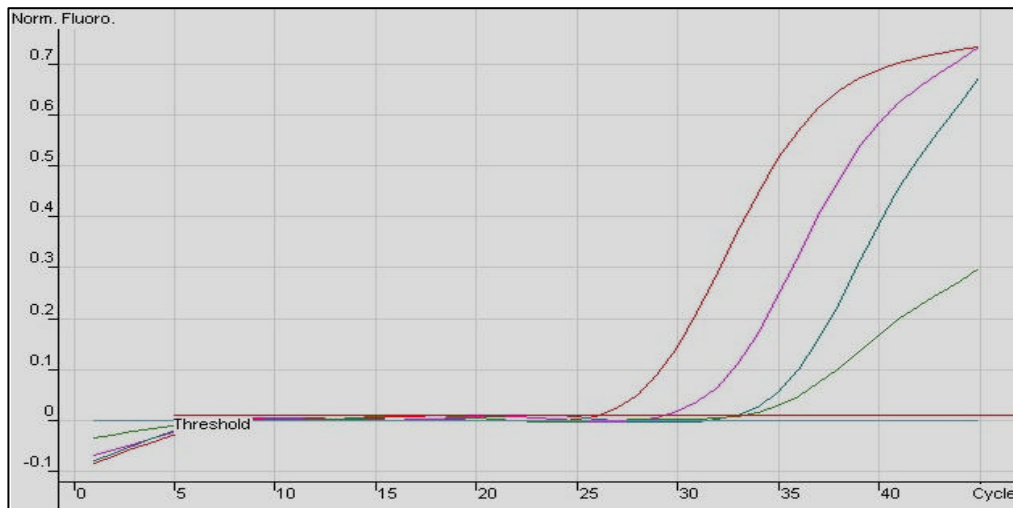


Figura 9. Resultados de la electroforesis en gel de agarosa previa RT-PCR convencional. Las bandas que se observan en los carriles 1, 2, 3, 4, corresponden a muestras del grupo control positivo y corresponden a ADNc del VHC con tamaño aproximado a 237bp.

5. Amplificación por RT-PCR en tiempo real.

Los resultados de la RT-PCR en tiempo real se obtuvieron en un equipo automatizado para la medición de copias genómicas en este caso de VHC. La medición se realiza mediante el uso de una curva de calibración típica con diferentes niveles de estándares de concentración conocida (Fig. 10). El equipo tiene la capacidad de mostrar el comportamiento de la curva de la emisión de fluorescencia para cada uno de los estándares y cada de las muestras en proceso (Fig. 11), además de mostrar la curva de comportamiento del control interno de cada una de las muestras procesadas (Fig. 6), característica única de la metodología de

PCR en tiempo real, esto se logra por la utilización de dos sondas fluorescentes distintas; FAM que demuestra el comportamiento de la amplificación y JOE que sirve de autocontrol.



Se observa la emisión de fluorescencia de los estándares del virus de VHC a distintas concentraciones (10, 100, 1000 y 10000 partículas virales), el comportamiento de la PCR de acuerdo a la concentración de cada uno de los estándares y la diferencia en el color de la sonda para cada nivel de concentración. (Tomada de Rotor-gene).

El método utilizado contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de una secuencia genómica de VHC de 240 bp y la detección directa de un amplicón en el canal de fluorescencia CyclingA.FAM del Rotor-gene.

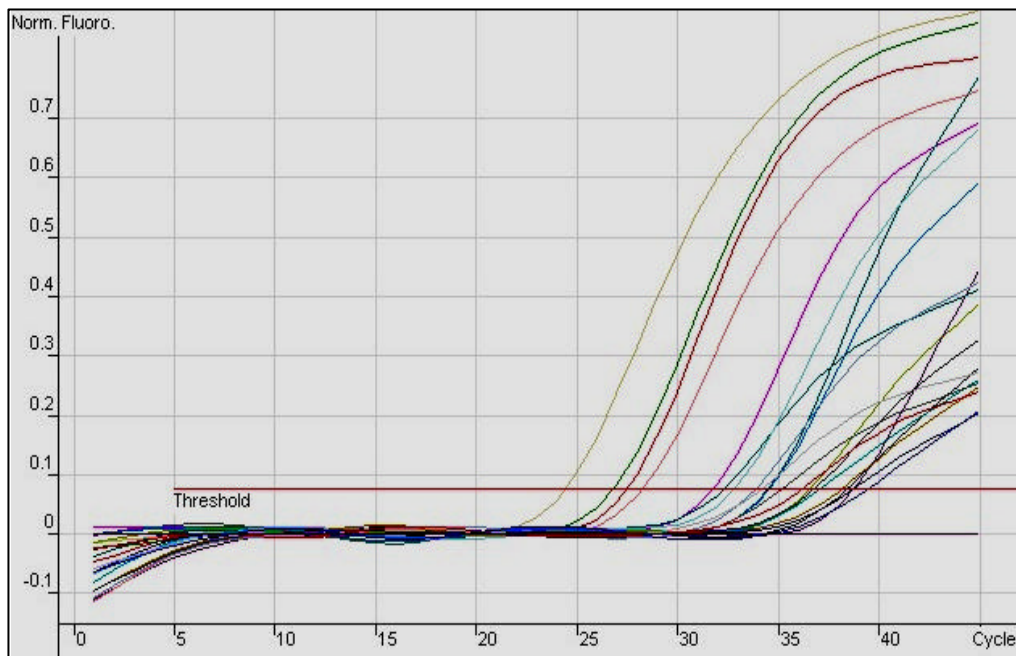


Figura 11. Gráfica de la curva de comportamiento de la emisión de fluorescencia de cada una de las muestras en esa corrida, después de cumplir con los 40 ciclos de amplificación. (Tomada de Rotor-gene)

Además contiene un segundo sistema de amplificación heterólogo para identificar posibles inhibiciones de la PCR, el cual es utilizado como un control interno y es detectado en el canal de fluorescencia CyclingA.JOE. Este segundo sistema de amplificación no tiene influencia sobre la PCR analítica y permite al usuario controlar los procedimientos de aislamiento y detectar una posible inhibición de la PCR. El volumen y el momento de agregarlo a la reacción dependen de que se quiera monitorear: el aislamiento, la presencia de inhibidores ó ambos. En la RT-PCR en tiempo real, se utilizan 2 fluoróforos diferentes, unidos ambos a la misma sonda, los cuales se leen en diferentes canales. La sonda que se lee en el canal de JOE funciona como control interno o autocontrol en cada muestra, ya que ésta sólo emite fluorescencia al unirse la sonda al ARN viral. En el caso de la sonda que se lee en el canal de FAM, ésta fluoresce sólo cuando se realiza la polimerización completa y se desprende de la sonda. Uno de los principios de la RT-PCR en tiempo real es que para el fluoróforo de la muestra, emita fluorescencia debe estar lejos del fluoróforo utilizado como control. De acuerdo a lo anterior la metodología utilizada de RT-PCR en tiempo real, puede arrojar 3 tipos de resultados diferentes, como se puede observar en la Tabla 7. Muestras positivas que contienen ARN del VHC, donde hay emisión de señal de fluorescencia en ambos canales de detección. Muestras negativas donde el ARN del VHC es no detectable, donde se detecta señal en el canal de JOE ó sonda de control interno y hay ausencia de señal en la sonda de FAM, que refleja la amplificación de los genomas. Resultados no concluyentes, donde la señal de los fluoróforos no es detectada. Los resultados de las muestras amplificadas por RT-PCR en tiempo real, se encuentran relacionados en el Apéndice No. 2.

Tabla 7. Resultados posibles por RT-PCR tiempo real - ROTOR-GENE

Tipo	CyclingA.FAM	CyclingA.JOE	RESULTADO
A	señal detectada	señal detectada	<i>muestra positiva = contiene VHC ARN</i>
B	señal no detectada	señal detectada	<i>muestra negativa = VHC ARN no detectable</i>
C	señal no detectada	señal no detectada	<i>= resultado no concluyente.</i>

Como se observa hay 3 resultados posibles: positivos, negativos y no concluyentes. Los positivos dependen de las señales fluorescentes emitidas por ambas sondas, FAM que se lee en el canal de CyclingA.FAM, y JOE que se lee en el canal de CyclingA.JOE. La sonda JOE es la sonda de control interno. La sonda FAM, es la que refleja la amplificación de los genomas. Cuando ninguna de las sondas emite señal de fluorescencia los resultados son no concluyentes, y se deben a la presencia de inhibidores.

La diferencia en los resultados de la RT-PCR convencional ó e punto final contra la RT-PCR en tiempo real se puede explicar en la Fig. 12, donde se encuentran graficados las dos formas de lectura según el método utilizado. En (A) se puede observar que al correr replicados de la misma muestra sí se leen al final de los ciclos de amplificación, los resultados presentan una gran variabilidad, esto debido al consumo de algunos de los componentes de la reacción. Al contrario en el caso de (B) que aplica para la PCR en tiempo real, las lecturas se realizan al inicio de la fase exponencial de la curva de emisión de fluorescencia, entre mayor sea la cantidad inicial del ADN en la muestra la emisión de fluorescencia se detecta a un menor ciclo de amplificación y en el caso contrario cuando la cantidad de ADN es muy pequeña la emisión de fluorescencia se detecta a un mayor número de ciclos de amplificación, independientemente de cual sea el caso, la lectura se toma al inicio de la emisión de señal y se sigue su comportamiento hasta el punto donde la curva cumple con el valor de la pendiente; se puede decir que hasta que pierde su fase logarítmica de emisión de fluorescencia y por lo tanto, hay un registro "uniforme" de la absorbancia.

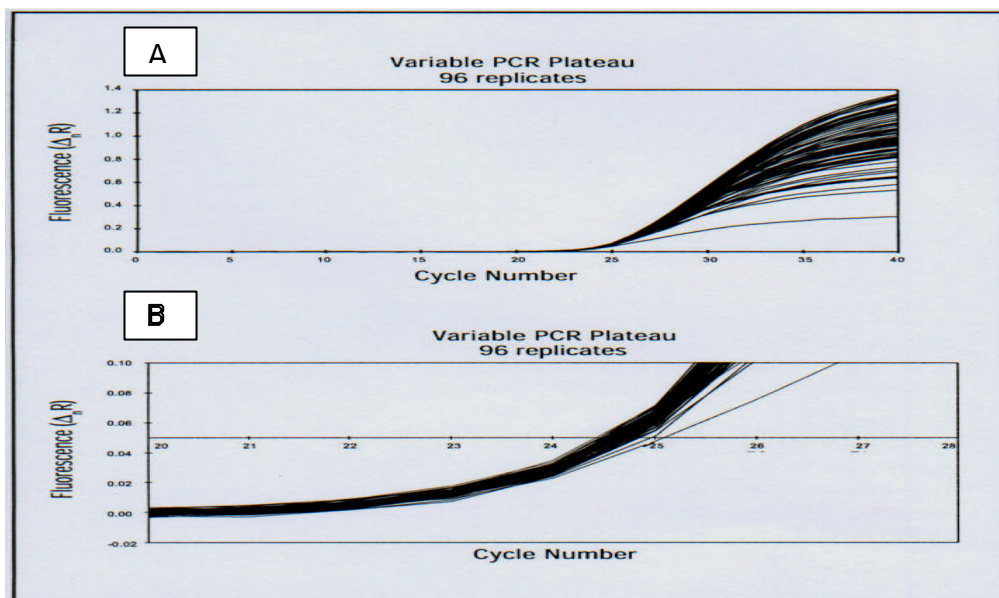


Figura 12. Diferencia entre resultados de RT-PCR convencional o de punto final vs. RT-PCR tiempo real. Observe la diferencia de las lecturas de réplicas de una misma muestra cuando la lectura se realiza al final de los ciclos de amplificación (A) y cuando se realiza al inicio de la emisión de fluorescencia (B). (Tomado de DNA/RNA por PCR – Biosystems)

El equipo utilizado presenta la facilidad que puede ser calibrado, vaya la comparación, de una forma tan fácil como si fuera un analizador de química clínica donde la experiencia nos dice que la cercanía o lejanía al valor real de los valores arrojados por una muestra en una medición específica, dependen en un alto porcentaje de la calibración del equipo, y ésta a su vez depende de 3 factores importantes: 1. Que la concentración del calibrador sea la que dice que es. 2. Que el reactivo se encuentre en las condiciones ideales para el proceso, sobre todo temperaturas de almacenamiento y corrimiento. 3. Que la dilución de muestra / reactivo sea siempre la misma, que no haya variabilidad en la dilución.

El hecho de contar con una curva de calibración nos permite hacer una comparación de la cantidad de emisión de fluorescencia entre una muestra desconocida y un calibrador de concentración conocida. El equipo se estandarizó con calibradores de concentración conocida y los datos obtenidos sirven para que el equipo elabore una curva de calibración lo cual convierte a la RT-PCR en tiempo real en un ensayo de cuantificación al mismo tiempo que amplifica, permitiendo que se detecte la amplificación de un genoma y se pueda cuantificar a la vez, eliminando la necesidad de manipular posteriormente los amplificadores para cuantificarlos; lo cual que nos da la ventaja metodológica sobre RT-PCR convencional. Además el método de la C_t ó línea basal ó de corte, como se conoce en el laboratorio clínico para algunas pruebas, nos permite detectar en un tiempo muy corto, que sí hay aumento en la señal fluorescente, hay aumento en los replicados de los genomas, y que a mayor concentración de genomas virales, mayor es la emisión de fluorescencia; por lo tanto, pasa la línea de corte en los primeros ciclos de amplificación (la muestra es positiva) y el valor de la señal es proporcional a la concentración de los genomas virales iniciales.

No se observa diferencia significativa durante la amplificación de los genomas copias virales, en relación al tipo de muestra utilizada, ya sea suero obtenido en tubos sin aditivos, suero en tubos con gel separador, plasma obtenido de muestras tomadas con EDTA o ACD como

anticoagulantes. Pero no se recomienda y/o no se permite la utilización de tubos con heparina para la recolección de muestras porque interfiere en el proceso de extracción cuando se utiliza el método de QIAgen.

Como parte de la utilización de la metodología de RT-PCR en tiempo real, se realizó un ensayo del dominio del método por el analista o EDMA, (los resultados en el anexo No. 3). Con los resultados obtenidos llegamos a la conclusión de que el equipo y el método cumplen con los requisitos mínimos de sensibilidad, especificidad, precisión, exactitud y límite de detección requeridos para que una prueba deba ser desarrollada en un laboratorio de prueba según lo marca la entidad mexicana de acreditación de pruebas (EMA).

La comparación de las diferentes metodologías utilizadas para diagnosticar la infección con el virus causante de la hepatitis tipo C, tiene la finalidad de demostrar con cual de ellas podemos detectar la presencia y/o infección con el VHC de forma más temprana y así contribuir a la disminución del daño al hepatocito causado por la replicación viral, lo que nos lleva a mejorar la calidad de vida del paciente infectado; porque hemos observado que el diagnóstico a través de anticuerpos es muy específico y sensible, pero no oportuno, ya que el periodo de ventana para la formación de anticuerpos en la mayoría de los pacientes es muy grande; lo anterior lo pudimos demostrar al procesar muestras negativas para anticuerpos y que arrojaron resultados positivos por RT-PCR en tiempo real en personal de riesgo (Tabla 8) y con el registro en historia clínica del tiempo transcurrido entre la sospecha de infección por hepatitis viral y el hallazgo de anticuerpos positivos, se tiene registro de 6 pacientes de los que formaron el grupo control positivo en los cuales se rastreo la formación de anticuerpos por más de 10 años.

Tabla 8. Relación del tiempo de exposición en Personal de Riesgo, con la aparición de ARN-VHC en suero.

PACIENTE	[RNA VIRAL] = Acs.(-) + RT-PCR t.r. (+)	AÑOS DE TRABAJO (Tiempo de exposición)
1	43.25	23
2	101.95	20
3	6.79	24
4	18.18	14
5	13.37	14
6	4.75	13
7	45.12	11
8	16.14	21
9	22.93	31

10	81.86	22
----	-------	----

Al analizar las muestras del grupo de riesgo se encontró que el 33% de las mismas fueron positivas por RT-PCR en tiempo real y con todas tenían resultados negativos por búsqueda de anticuerpos, estos resultados son alarmantes porque el porcentaje de positividad es muy alto. Aquí vale la pena revisar varios puntos el tipo de actividad realizada, hacer un examen de conciencia para detectar otras actividades de riesgo, las precauciones que se tienen y se han tenido al manejar productos biológicos potencialmente infectados. La media en años de trabajo que se observó fue de 20.7 años, pero esto no quiere decir que todos los que hemos trabajado en el área de la salud por 20-21 años vamos a estar infectados con VHC y la media de la concentración de partículas virales fue de 39.4 UI/mL.

Al analizar la relación que existe entre el tiempo de exposición a factores de riesgo y la concentración de la carga viral en trabajadores de la salud, observamos que no hay un patrón establecido porque personal con menos años de exposición presenta cargas virales elevadas y personal con mayor tiempo de exposición no necesariamente presenta cargas virales elevadas (Tabla 8). Por otro lado, ambas metodologías de RT-PCR, convencional o de punto final y tiempo real, se compararon con la finalidad de determinar las ventajas de una sobre la otra. Al analizar por RT-PCR en tiempo real, las muestras con resultados negativos para búsqueda de anticuerpos (112 de 128 que equivalen a un 87.5%) encontramos que un número importante de las mismas (17 de las 112, que corresponden a un 15.17%) arrojaron resultados positivos para la metodología de biología molecular. Ver Tabla 9. Este resultado es de alta significancia porque indica que el diagnóstico de infección con VHC a través de la metodología de ELISA, donde se buscan y determinan anticuerpos totales específicos contra el virus de hepatitis C, arroja un porcentaje importante de falsos negativos; y segundo que con el uso de una metodología basada en biología molecular se cumplen nuestras expectativas, encontrar un método de diagnóstico temprano, y de relativamente fácil manejo, para la determinación de la infección con VHC.

Tabla 9. Diferencia observada según el método utilizado en el Dx de VHC

M U E S T R A S		Dx. Acs.		Dx. RT-PCR t.r	
		Positivos	negativos	positivos	negativos
tipo	numero				
ENFERMOS	16*	16*	0	16	0
RIESGO	30	0	30	11	19
SANOS	70	0	70	6	64
CONTROL NEGATIVO	12	0	12	0	12
TOTALES	128	16	112	33	95
PORCENTAJES	100 %	12.5 %	87.5 %	25.78 %	74.2%

Se observa que el 20.5% de las muestras negativas para anticuerpos fueron positivas por

RT-PCR tiempo real, lo que significa que la búsqueda de VHC a través de la formación de anticuerpos arroja resultados falsos negativos, porque solo demuestra la formación de los mismos, pero no permite demostrar la presencia de los genomas virales en los pacientes.

Al comparar cualitativamente los resultados en la búsqueda de anticuerpos totales y por RT-PCR en tiempo real, observamos resultados por demás interesantes, alrededor del 15% de las muestras negativas por anticuerpos son positivas por PCR en tiempo real. En la Tabla No.9 se observa que alrededor del 26% del total de las muestras fueron positivas por RT-PCR tiempo real, lo que significa que la búsqueda de VHC a través de la formación de anticuerpos arrojó resultados falsos negativos en el 15% de las muestras, esto se explica, porque sólo demuestra la formación de los mismos, pero no permite demostrar la presencia de los genomas virales en los pacientes.

La otra información que llama la atención es la concentración de ARN viral en muestras donde la búsqueda de anticuerpos arrojó resultados negativos. Al observar el valor obtenido por RT-PCR en tiempo real de los casos antes mencionados vemos que las concentraciones son bajas, lo que en un momento puede explicar la ausencia de anticuerpos por ser pacientes recién infectados ó por presentar una baja replicación viral ó por acción del interferón natural en la replicación viral. Ver Tabla 10. Estos resultados, nos permiten evaluar la presencia y/o ausencia de daño hepático y deben considerarse como la carga viral inicial (al momento de la detección), de ahí que se recomienda hacer una concienzuda historia clínica, para evaluar la posibilidad de dar al paciente un tratamiento capaz de inhibir la replicación viral desde etapas tempranas de la infección, también nos parece de vital importancia tener un seguimiento de los valores de la carga viral aún y cuando los pacientes sigan asintomáticos, así como la evaluación del daño hepático de forma rutinaria.

Tabla 10. [ARN viral de VHC] en pacientes con anticuerpos negativos y RT-PCR (+).

Paciente	Rastreo de Anticuerpos (--)	RT-PCR (+) Valor de la carga viral
1	0	560
2	0	438
3	0	196
4	0	102
5	0	82
6	0	45
7	0	43
8	0	43
9	0	35
10	0	23

11	0	18
12	0	16
13	0	13
14	0	7
15	0	5
16	0	3

La concentración de ARN viral en muestras donde la búsqueda de anticuerpos arrojó resultados negativos presenta valores bajos (menos de 1000 copias). Esto puede explicar la ausencia de anticuerpos, o ser pacientes recién infectados ó por presentar una baja replicación viral ó por acción del interferón natural en la replicación viral. Estos valores se pueden considerar la carga viral inicial al momento de hacer el Dx. Se omite un valor de 5011, se tomó nueva muestra al paciente para búsqueda de Acs. vs. VHC y medición de carga viral por RT-PCR convencional, muestra procesada en agosto/2004. con resultados positivos a anticuerpos.

Se hizo la comparación de los resultados obtenidos por los dos métodos de RT-PCR (convencional vs. tiempo real) en el grupo control positivo, donde observamos una gran diferencia entre el valor obtenido entre un método y otro, que se explica a hacer el análisis del fundamento de cada método y la forma de realizar las lecturas entre ambos métodos.

En total se manejaron 4 grupos diferentes de muestras: el grupo control positivo con muestras de pacientes que se conocían como positivas al VHC originalmente por anticuerpos y luego por biología molecular, el grupo control negativo, negativo a todas las formas de diagnóstico y provenientes de personas sin factores de riesgo, el grupo de riesgo, trabajadores del área de la salud y el grupo de población abierta observaron los siguientes resultados:

- Grupo positivo: se confirma la presencia de los genomas virales por los 3 métodos utilizados, búsqueda de anticuerpos, RT-PCR convencional y RT-PCR tiempo real.
- Grupo negativo: se confirma la inexistencia de genomas virales 3 métodos utilizados, búsqueda de anticuerpos, RT-PCR convencional y RT-PCR tiempo real.
- Grupo de riesgo: todos negativos al rastreo de anticuerpos y el 29% positivos por RT-PCR tiempo real
- Grupo de población abierta, considerados como "sanos": todos negativos al rastreo de anticuerpos y el 8.6% positivos por RT-PCR tiempo real.
- Del total de muestras procesadas, al inicio del trabajo, se conocían como positivas a VHC el 12.5% (16 muestras) y como resultado final se obtuvo un 25.78% de muestras donde se confirmó la presencia de genomas virales de VHC.

DISCUSIÓN

En la RT-PCR convencional la lectura se realiza al final del ciclo 40 de amplificación y en la RT-PCR en tiempo real se realiza en los primeros ciclos cuando se detecta la señal de emisión de fluorescencia; esto hace, que si comparamos las lecturas de ambos métodos con una curva de una cinética enzimática en el caso de la RT-PCR convencional, leemos en la fase de saturación de los reactivos, donde la saturación y/o la falta de los mismos limita la amplificación en los últimos ciclos; en el caso de la RT-PCR en tiempo real la lectura se realiza al inicio de la fase exponencial ó logarítmica cuando los reactivos son más que suficientes para amplificar los genomas presentes en la muestra y además donde observamos una recta en la gráfica de amplificación, lo que significa que la amplificación guarda una relación lineal cuando menos en los primeros ciclos. Esto se traduce a su vez en un método más confiable y de alguna manera más exacto, porque las lecturas se realizan en las condiciones ideales para la amplificación, y porque las lecturas se hacen en referencia a una curva estándar, con calibradores de valor conocido y de diferentes niveles.

Al relacionar la vía de contagio y el genotipo viral, se confirma que la incidencia de la infección depende en casi la mitad de los casos a transfusiones y en una cuarta parte de ellos esta relacionada con drogadicción. En estos resultados dependemos no sólo de determinaciones de laboratorio, sino de la capacidad y compromiso del médico para hacer las llamadas notas médicas, de cuya veracidad y acertividad, todos sabemos dependen la mayor parte del tiempo los diagnósticos clínicos.

Otros resultados por demás interesantes y al mismo tiempo alarmantes son los observados cuando se comparan el tiempo de laborar en áreas de alto riesgo y la incidencia de personal que presenta prueba para anticuerpos negativa y prueba por biología molecular positiva.

Donde no se observa un patrón definido que indique que el tiempo de exposición sea un factor determinante, porque tenemos personal con relativamente pocos años de trabajo y carga viral baja y personal con el triple de años de trabajo que el caso anterior y también se observan cargas virales bajas.

Creemos haber logrado nuestro objetivo, encontrar un método de diagnóstico temprano para la infección por virus causante de la hepatitis C, esto al comparar los resultados del rastreo de anticuerpos versus los resultados de la RT-PCR en tiempo real. Con el primer método diagnóstico sólo el 12.5% de las muestras fué positivo a anticuerpos contra el VHC; en el segundo método diagnóstico, la RT-PCR en tiempo real el 25.8% de los resultados demuestran la presencia de genomas virales de VHC.

Al comparar ambas metodologías de RT-PCR, se identifican las siguientes bondades de la RT-PCR en tiempo real:

- ◆ Las lecturas se realizan en los ciclos donde no hay consumo de reactivos.
- ◆ Los resultados de la amplificación se registran cada ciclo.
- ◆ La inclusión de una curva estándar lo hace un método estandarizado de fácil manejo donde se guarda una relación lineal entre la Ct y la cantidad inicial de ADNc.
- ◆ La sonda control permite detectar desde el inicio de la reacción la presencia y la acción de inhibidores.
- ◆ El tiempo de proceso es menor y el método está más estandarizado, en el sentido de que es un método automatizado, por lo tanto, en teoría los errores que se presenten serán sistemáticos y con el mismo efecto sobre calibradores, controles y muestras y no serán errores puntuales.
- ◆ Se elimina el procesamiento posterior de los productos de PCR para su cuantificación, lo que reduce una fuente potencial de error post-PCR.

Al interpretar los resultados arrojados por el EDMA, observamos que cuando el analista adquiere experiencia en el manejo de las muestras y sobre todo en el pipeteo, los valores de la pendiente y el coeficiente de correlación entre los controles son muy aceptables, por lo tanto, se certifica que la información que da el proveedor del equipo con relación a sensibilidad y especificidad son reproducibles en condiciones de trabajo de rutina.

Al analizar la información epidemiológica obtenida de los resultados de los estudios realizados, consideramos, como ya se ha hecho en otros trabajos, a la RT-PCR como el estándar de oro de las pruebas diagnósticas para el VHC, encontrando que la eficacia diagnóstica de los métodos cambia de la siguiente forma: para la búsqueda de anticuerpos totales versus VHC la sensibilidad baja a un 32% y la especificidad se mantiene en un 98.3%; para la RT-PCR en tiempo real la sensibilidad se calcula en un 94% y su especificidad en un 97.7%, valores bastante aceptables y que cumplen con los requisitos internacionales.

Al comparar los resultados positivos por anticuerpos y por RT-PCR, observamos que un 17% de las muestras negativas para anticuerpos, arrojaron resultados positivos por RT-PCR, esto nos hace creer que ese 17% de las muestras realmente arrojaron resultados falsos negativos en la prueba por anticuerpos, esto tiene significancia puesto que es la prueba de elección para tamizaje en bancos de sangre, principal fuente de infección por VHC. Si trasladamos estos valores, tendríamos que un 17% de las determinaciones por anticuerpos tendrían resultados falsos negativos, lo que significa que estando positivos se reportan negativos, cuando realmente están infectados por el VHC. Esta observación se agudiza cuando tratamos por separado las poblaciones estudiadas. En población abierta donde se obtuvieron 70 muestras de las cuales 6 fueron positivas por RT-PCR, que corresponden a un 8.6% de la población abierta con resultados falsos negativos por anticuerpos. Pero en las muestras de la población de alto riesgo, en este caso trabajadores del área de salud, donde se obtuvieron 30 muestras de las cuales 11 fueron positivas por RT-PCR, el porcentaje de falsos negativos por anticuerpos corresponde a un 36.6%. Lo anterior es muy grave porque representa que las medidas de asociación y de impacto potencial dentro de la epidemiología son diferentes cuando se utiliza un método u otro, en el caso de utilizar RT-PCR tenemos que la frecuencia y el riesgo relativo de la enfermedad se elevan al doble y la incidencia hasta 4 veces más. La observación anterior modifica las variables epidemiológicas de la infección. Si los valores de falsos negativos en población abierta los trasladamos a las determinaciones de anticuerpos vs. VHC que se realizan en los bancos de sangre, tenemos que un 17% de las sangres que actualmente se transfunden como seronegativas al VHC son realmente positivas y están infectando a los receptores; además del costo que implica el tratamiento, aquí la determinación de anticuerpos no se puede considerar una prueba que nos sirva como factor de protección a los receptores

sanguíneos. Por otro lado, si los valores de falsos positivos con anticuerpos se aplican a personal de riesgo, esto significaría que su vida laboral puede ser reducida por efecto de la infección, en el caso de trabajadores del sector salud el gasto por incapacidades será más elevado, esto aunado al costo del manejo, sostenimiento y tratamiento del trabajador.

RECOMENDACIONES

En relación con el trabajo:

1. Buscar los medios para que en la medida de lo posible, no haya una diferencia significativa en tiempo, entre la búsqueda de anticuerpos específicos y la búsqueda ó cuantificación de copias virales para el VHC.
2. Diseñar un modelo de muestreo que permita disminuir lo más posible el tiempo de congelación de las muestras para determinaciones por metodologías de biología molecular (PCR).
3. Tratar que el diseño del trabajo considere que en las muestras que se vayan a procesar en otra ciudad, su traslado lo más directo posible para evitar descongelamientos y prisas.
4. Procurar procesar el mayor número de muestras y/ó de pruebas a realizar en el lugar en se toman (de origen).
5. En la medida de lo posible adquirir un mismo lote de cada uno de los reactivos necesarios, para todo el proyecto en caso de trabajos a mediano y largo plazo.
6. Procurar que el material necesario para la realización del proyecto, sea adquirido todo al mismo tiempo y de la misma calidad, ya sea en compra y/ó preparación de reactivos.
7. Garantizar, previo al inicio de las mediciones, que los equipos a utilizar estén en condiciones óptimas de trabajo ó en su defecto contar con el apoyo de un servicio de

mantenimiento especializado, para evitar duplicidad en el gasto de reactivos por falla en los equipos.

En relación con el método utilizado:

1. Buscar los recursos para adquirir un equipo de extracción de ARN de acuerdo al tipo de muestra que se va a utilizar, porque son métodos estandarizados y bien definidos, donde las casas comerciales que los producen ya tienen identificadas las zonas más conservadas, en este caso de los virus ARN y que son las ideales para la amplificación.
2. Definitivamente consideramos que la PCR en tiempo real es un método que aventaja a la PCR tradicional, por las razones mencionadas en el presente trabajo y lo recomendamos ampliamente para determinaciones cualitativas y cuantitativas de secuencias genómicas de interés, sobre todo para aquellas relacionadas con salud, porque permite obtener resultados dentro de los estándares de calidad - precisión y exactitud – requeridos al manejar muestras clínicas.

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

1. Se sugiere “extraer” y/o “depurar” el complejo formado por ARN viral y el “primer” y el ADN copia formado y secuenciarlo, para garantizar y/o demostrar que en todos los genotipos la amplificación viral se lleva a cabo en la misma región, que se supone es la más conservada y cercana al extremo 5’.
2. Contar con material de control ó referencia certificado, sobre todo en las cuantificaciones, primero verificar si la capacidad de la PCR en tiempo real cumple y/o es tan eficiente como parece ser ó se cree que es y segundo para cumplir con los mandatos de la entidad mexicana de acreditación de pruebas en laboratorios de ensayo y/o medición.
3. Buscar una fuente de muestras más amplia, como serían las muestras que se generan diariamente en un banco sangre; lo cual correspondería a un muestreo con menos sesgo, porque los donantes de sangre son población abierta y en apariencia sana y aún así nos encontramos que en los bancos de sangre locales entre un 5-8% de las bolsas que pasan por pruebas de tamizaje se desechan, porque tienen resultados positivos a la búsqueda de anticuerpos totales específicos contra el virus causante de la Hepatitis C.
4. Realizar una cuantificación de la subpoblación de linfocitos, de los pacientes con anticuerpos negativos y RT-PCR positiva, para conocer de alguna forma su “status” inmunológico y entender los resultados anteriores.
5. Se propone que para el diagnóstico de la infección por el virus causante de la hepatitis C, la cual actualmente se realiza de forma rutinaria por búsqueda de anticuerpos, se

utilice la RT-PCR tiempo real. Al principio el método de diagnóstico de laboratorio tendrá un costo mayor (entre 3 y 4 veces más) que el rastreo de anticuerpos específicos, el cual disminuirá conforme avance el tiempo y las metodologías de biología molecular sean pruebas de rutina en los laboratorios. La disposición de cambiar el método nos ofrecería un diagnóstico oportuno y la detección de la infección a etapas tempranas, donde se especula que el tratamiento sería básicamente para inhibir la replicación viral, lo cual nos llevaría también a disminuir el daño hepato-celular y por consecuencia los problemas inmunológicos que observan en la mayoría de los pacientes. Por lo anterior, considero que el diagnóstico oportuno, con el tiempo favorecerá la disminución del costo global de diagnóstico y tratamiento. Un problema financiero importante en las Instituciones de Salud y en la población general, es el tratamiento de las enfermedades crónico-degenerativas y el de las infecciones que tienden a cronicidad como VIH, VHC, y Tuberculosis; el gobierno realiza un censo semestral de este tipo de enfermedades, con el objetivo de conocer el gasto en el manejo y tratamiento de este tipo de pacientes, para programar las partidas futuras; y en algunos casos para delimitar el tipo de apoyo se brindará a los pacientes. Para lograr lo anterior, se sugiere que las Instituciones que prestan servicios de Salud en el Estado de Chihuahua, busquen los apoyos necesarios con organizaciones interesadas en aportar fondos para investigación en el área de la salud, y correr por duplicado un determinado número de muestras (que cada Institución determinará de acuerdo al número de pacientes infectados con VHC al momento de hacer el diseño del estudio), y analizar los resultados de forma prospectiva y observar la utilidad de cada metodología, relacionar los resultados de laboratorio con el gasto generado por cada paciente y ver a largo plazo sí el diagnóstico oportuno tiende a disminuir el gasto en cada paciente infectado con VHC, como en teoría se espera.

G L O S A R I O

ADN. Ácido desoxirribonucleico. Polímero de nucleótidos unidos por un esqueleto de fosfato-desoxirribosa. Es considerado el material genético de la célula.

ARN. Ácido ribonucleico. Polímero de nucleótidos unidos por un esqueleto de fosfato-ribosa. Interviene en la síntesis de proteínas.

Carga viral. Número de copias virales presentes en una muestra determinada de un virus en particular.

C_t. Parámetro que se define como el número de ciclo en el cual la fluorescencia pasa la línea de corte o línea basal (threshold), a partir de ese ciclo se detecta un aumento en la señal fluorescente y esto a su vez significa que hay un aumento en los replicados y/o copias de los genomas.

Especificidad. 1. Capacidad de la respuesta inmunitaria para interactuar con antígenos individuales. 2. Probabilidad de que la prueba resulte negativa cuando el individuo en realidad no presenta el padecimiento.

Exactitud. Al procesar muestras de valor conocido los resultados de las mismas deben estar en puntos lo más cercanos al valor verdadero, en este caso valor asignado a la muestra control ó muestra patrón.

Flavivirus. Virus ARN monocatenarios de sentido positivo y con envoltura. Se replican en el citoplasma de la célula que los alberga y atraviesan las membranas por gemación.

Fluoróforo. Sinónimo de fluorocromo, compuesto que tiene la propiedad de absorber luz de una longitud de onda y emite luz en otra longitud de onda diferente. La brillantez de la fluorescencia observada depende de la eficiencia con la cual el colorante convierte la luz incidente en luz fluorescente, de la concentración del colorante

sobre las muestras y la intensidad de la radiación excitante (absorbida).

Gen. Unidad hereditaria, segmento de ADN que codifica a una determinada proteína, cadena polipeptídica, un ARN t ó un ARN r.

Genoma. Conjunto completo de genes de un organismo. Información genética total que posee un organismo.

Precisión. Término estadístico relacionado a los resultados de una misma muestra de valor conocido que no deben variar entre ellos más de un 5% como máximo.

Primers. Término en inglés para denominar a los cebadores, ó segmentos cortos de RNA que se requieren para iniciar la síntesis de ADN. Molécula (generalmente un polinucleótido) a la cual la ADN polimerasa une el primer nucleótido durante la replicación del ADN.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa. Método para amplificar una secuencia específica de ADN in vitro mediante ciclos repetidos de síntesis y el uso de cebadores específicos y ADN polimerasa.

Replicación. Síntesis de ADN utilizando un ADN como molde. La replicación de los virus es dependiente del ácido nucleico que lo forma, en el caso de los virus ARN del sentido del virus (positivo o negativo).

Reproducibilidad. Término utilizado cuando al correr una misma muestra se obtienen resultados iguales y/o con mínima diferencia (menos de 5%).

RT-PCR. Transcripción en reversa de la reacción en cadena de la polimerasa. Permite el análisis de la expresión genética y/ó detectar secuencias poco frecuentes de un genoma, a partir de ARN. Utiliza un oligonucleótido de Timinas que alinea con colas de poli A que actúa como iniciador / cebador de 5' a 3' formando un ADN copia (ADNc).

Sensibilidad. Capacidad de una prueba para detectar cuando hay ó no enfermedad, es la probabilidad de que la prueba resulte positiva cuando el individuo realmente tiene la enfermedad. Valor muy importante cuando la enfermedad es de mal pronóstico, que elimina la posibilidad de falsos negativos.

SIDA. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, relacionado con la infección por VIH y la baja concentración de linfocitos T CD4+.

VHC. Virus causante de la hepatitis C, infección restringida a hepatocitos en cuanto a replicación viral, pero los genomas virales se encuentran en líquidos orgánicos sin

perder su capacidad infectiva.

VIH. Virus causante de la inmunodeficiencia humana. También se conocen como (VIH +) a aquellas personas infectadas por el VIH, con anticuerpos positivos y que aún no presentan sintomatología relacionada con la infección.

Viremia. Se denomina con ese término a la presencia de virus en sangre.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., Pober. J.S.. 1998. *Inmunología Celular y Molecular*. Interamericana-McGrawHill. Tercera Edición: Capitulo 16: Inmunidad frente a los microorganismos, Págs. 390-393.
2. Alfonso de Araujo, E.S., y colaboradores. Hepatitis C viral load not predict disease outcome: going beyond numbers. *Revista do Instituto de Medicina tropical e Sao Paulo, Brazil*. 06:05:2002
3. Baumert, T.F., S.Ito, D.T. Wong, and T.J. Liang. 1998. Hepatitis C Virus Structural Proteins Assemble into Viruslike Particles in Insect Cells. *Journal of Virology*. 72:3827-3836.
4. Davis GL, Lau JYN. Factors predictive of a beneficial response to therapy of hepatitis C. *Hepatology* 1997; 26 (suppl1):1225-1275.
5. Deleersynder, V., A. Pillez, C. Wychowski, K. Blight, J. Xu, Y.S. Hahn, C.M. Rice, and J. Dubuisson. 1997. Formation of Native Hepatitis C Virus Glycoprotein Complexes. *Journal of Virology*. 71:967-704.
6. Fallows G, Kaita K, Minuk G, et al. Early changes in hepatitis C virus (HCV) RNA levels predict response to interferon treatment in noncirrhotic HCV patients. *Can J. Gastroenterol* 2000; 14(supplB):30B-35B.
7. Ferenci P, Shiffman ML, Fried M et al. Early prediction of response to 40KDA perinterferon alfa-2a (PEGASYS) plus ribavirin (RBV) in patients with chronic hepatitis C (CHC). *Abstract: American Association for the study of Liver Disease, 52nd Annual Meeting, Noviembre 9-13, 2001, Dallas, EUA*.
8. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Pegylated interferon alfa-2a in combination with ribavirin: Efficacy and safety results from a phase III, randomized, actively-controlled, multicenter study. *Gastroenterology* 2001; 120(suppl1):A55.
9. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10, 413-417.

10. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1992). Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11, 1026-1030.
11. Holland, P. M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 7276-7280.
12. Hoofnagle, J.H. Hepatitis Place: The Clinical Spectrum of Disease. 1999. <http://www.hepplace.com/CCHoof.html>
13. Ian, M.M., Arden K.E., Nitsche A. 2002. Real time PCR in virology, survey and summary. *Nucleic Acids research*, vol. 30, No.6, 1292-1305. Oxford University Press.
14. Karino Y, Toyota J, Sugawara M, et al. Early loss of serum hepatitis C virus RNA can predict a sustained response to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *AmJGastroenterol* 1997;92:61-65.
15. Koshy A, Marcellin P, Martinot M, et al. Improved response to ribavirin interferon combination compared with interferon alone in patients with type 4 chronic hepatitis C. *Hepatology* 1981; 5:431-435.
16. Lagging, L.M., K. Meyer, R.J. Owens, and R. Ray. 1998. Functional Role of Hepatitis C Virus Chimeric Glycoproteins in the Infectivity of Pseudotyped Virus. *Journal of Virology*. 72: 3539-3546.
17. Lee, L.G., Connell, C.R., and Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res*. 21, 3761-3766.
18. Lee SS, Heathcote EJ, Reddy KR et al. Prognosis factors and early predictability of sustained viral response (SVR) in patients treated with pegylated interferon alfa-2a; a new profile. *Hepatology* 2000; 32(4,pt2):370A.
19. Lindsay KL, Therapy of hepatitis C: overview. *Hepatology* 1997; 26(3,suppl1):71S-77S.
20. Livak, K.J., flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., and Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*. 4, 357-362.
21. Livak, K.J., ABI prism 7700 sequence detection system, User Bulletin No. 2. 1997. PE Applied Biosystems.
22. Lyamicher, V., Brown, M.A.D., and Dahlberg, J.E. 1993. Structure-specific endonucleolytic cleavage of nucleic acids by eubacterial DNA polymerases. *Science* 260: 778-783.
23. Min AD, Jones JL, Bodian C, et al. Rapid viral decline predicts efficacy of combined interferon and ribavirin therapy in chronic HCV resistant to interferon monotherapy *Hepatology* 2000;32(4,pt2):360A.
24. Minuk, G. and N. Assy. 1999. *What Are the Consequences of Chronic HCV*.

25. Murray, P.R., Kobayashi, G.S., Pfaller, M.A., Rosenthal, K.S.. 1997. *Microbiología Médica*. Harcourt Brace. Segunda Edición: Capitulo 68: Virus de las Hepatitis, Págs. 702-718.
26. Neumann AU, Zeuzem S, Brunda MJ, et al. Rapid virologic response to treatment with pegylated interferon alfa-2³ is strongly predictive of a sustained virologic response in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32(4,pt2):318A.
27. Nishiguchi S, Ueda T, Itoh T, et al. Method to detect substitutions in the interferon-sensitivity-determining region of hepatitis C virus 1b for prediction of response to interferon therapy. *Hepatology* 2001 Jan;33(1):241-7.
28. Noursam JBS, Pol B, Nalpas P, et al. Hepatitis C virus type 1b (II) infection in France and Italy. *Ann Intern Med* 1995; 122:161-168.
29. Poynard T, Marcellin P, Lee S, et al. Randomised trial of interferon (2b + ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alfa 2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998; 352:1426-1432.
30. Saito S, Tanaka K, Ikeda M, et al. Early disappearance of hepatitis C virus RNA from the liver during interferon-B treatment predicts outcome in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2000; 32(4,pt2):360A.
31. Sansonno, D., C. Lotesoriere, V. Cornacchiulo, M. Faneeli, P. Gatti, G. Iodice, V. Racanelli, and F. Dammacco. 1998. Hepatitis C Virus Infection Involves CD34+ Hematopoietic Progenitor Cells in Hepatitis C Virus Chronic Carriers. *Blood* 92:3328-3337.
32. Schaechter, M., N.C. Engleberg, B.L. Eisenstein, and G. Medoff. 1998. *Mechanisms of Microbial Disease*. 3rd Edition: 391-402.
33. Shawn, L. Hepatitis Place: Transmission of Hepatitis C (1999). <http://www.hepplace.com/trans.html>.
34. Schalm SW, Fattovich G, Brouwer JT. Therapy of hepatitis C: patients with cirrhosis. *Hepatology* 1997; 26(3,suppl1):128S-132S.
35. Shibata, M., T. Morizane, T. Uchida, T. Yamagami, Y. Onozuka, M. Nakanao, K. Mitamura, and Y. Ueno. 1998. Irregular regeneration of hepatocytes and risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis and cirrhosis with hepatitis C virus infection. *The Lancet* 351:1773-1777.
36. Shiratori Y, Omata M. Predictors of the efficacy of interferon therapy for patient with chronic hepatitis C before and during therapy: how does this modify the treatment course? *J. Gastroenterol Hepatol* 2000; 15(suppl):E141-E151.
37. Soriano V, Bravo R, Garcia-Samaniego J, et al. Relapses of chronic hepatitis C in HIV-infected patients who respond to interferon therapy. *AIDS* 1997; 11:400-401.
38. Soriano V, Rodríguez-Rosado R, Garcia-Samaniego J. Management of chronic hepatitis C in HIV-infected patients. *AIDS* 1999; 13:539-546.

39. Trustees of Dartmouth College. *Hepatitis C: The Facts: Hepatitis C*. (1998).
<http://www.epidemic.org/theFacts/hepatitisC>
40. Tsai, S., Y. Chen, M. Chen, C. Huang, I. Sheen, C. Yeh, J. Huang, G. Kuo, and Y. Liaw. 1998. Hepatitis C Virus Circumventing Cytotoxic T Lymphocyte Activity as a Mechanism of Chronicity. *Gastroenterology* 115:954-966.
41. T. Stuart Walter. 2000. *Microbiología*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Primera Edición: Capítulos 19 y 21: Págs. 341-365 y 400-428.
42. figment@nettally.com
43. Transfusion Medicine Intro. htm – Departament of Transfusion Medicine.
42. Third wave presents at CIBC World markets health care conference. Nov 5, 2002. Lance Fors Ph.D. CEO
43. Toth, C.M., M. Pascual, R.T. Chung, F Graeme-Cook, J.L. Dienstag, A.K. Bhan, and A.B. Cosimi. 1998. Hepatitis C virus-associated fibrosing cholestatic hepatitis after renal transplantation. *Transplantation* 68:1254-1257.
44. Wang, Y.H., R. Trowbridge, and E.J. Gowans. 1997. Expresion and Interaction of the Hepatitis C Virus Structural Proteins and the 5' Untranslated Region in Baculovirus Infected Cells. *Archives of Virology*. 142:2211-2233.
45. Wang, T., and Brown, M. J. (1999). mRNA quantification by real time Taq Man polymerase chain reaction: Validation and comparison with RNase protection. *Anal. Biochem.* 269, 198-201.
46. Weihong L., Saint D.A. 2002. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase Caín reaction assay based on simulation of polymerasa Caín reaction kinetics. *Analytical biochemistry*. 302, 52-59.
47. Weihong L., Saint D.A. 2002. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical research Communications* 294, 347-353. *Academicpress*.
48. DNA/RNA Real-time quantitative PCR. PE Biosystems.
49. Zein NN. Clinical significance of hepatitis C viral genotypes. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13:223-235.
50. Zeuzem S, Feinman V, Rasenack J, et al. peginterferon alfa-2a in patients with chronic hepatitis C. *N Engl J Med* 2000; 343:1666-1672.
51. Zylberberg H, Chaix ML, Chot C. Infection with hepatitis C virus genotype 4 is associated with a poor responder to interferon alfa. *Ann Intern Med* 2000; 132:845-846.

A P E N D I C E 1.

Resultados del análisis espectrofotométrico del ARN extraído y purificado.

A P E N D I C E 2.

Resultados de las muestras amplificadas por RT-PCR en tiempo real.

A P E N D I C E 4.

Ensayo DEL dominio del método por el analista (EDMA)

