

VALOR DIAGNOSTICO DE LA DETECCION DE VHC POR P.C.R.

Dra. Gabriela Muñoz G.

*Lab. Virología Centro Gastroenterología
Hospital Clínico U. de Chile*

1.- BREVE DESCRIPCION DE METODO P.C.R. (Polymerase Chain Reaction)

Definición: Proceso de amplificación enzimática de ácidos nucleicos in vitro a partir de mínimas cantidades de DNA o RNA.

Principio: Se basa en la repetición de ciclos de 3 etapas bajo condiciones controladas de temperatura, donde el número de moléculas de DNA se duplica después de cada ciclo, semejando lo que ocurre en la replicación de DNA in vivo.

Etapas de PCR:

a) Denaturación de DNA: separación de las hebras de DNA molde mediante incubación a altas temperaturas (92-95 C).

b) Pareamiento de oligonucleótidos (primer annealing): unión de oligonucleótidos específicos (primer) a las hebras de DNA denaturadas, donde cada primer es complementario a una de las cadenas originales de DNA de interés. Proceso ocurre al descender la temperatura, generalmente entre 37-55 C.

c) Extensión de oligonucleótidos: extensión del complejo DNA molde-primer mediado por una enzima DNA polimerasa. Ocurre generalmente a 72 C de temperatura.

- Un ciclo típico (3 etapas) toma entre 3 a 5 minutos y se repite habitualmente entre 20 y 40 veces para obtener una buena amplificación que permita ser detectada por técnicas convencionales (Northern blot, Southern blot, sondas).

2.- APLICACIONES DE P.C.R.

- Secuenciación directa
- Clonamiento
- DNA typing
- HLA typing

- Mutagénesis dirigida
- Detección de variaciones genéticas
- Detección de microorganismos infecciosos.

3.- RNA - PCR

Una secuencia de RNA también puede ser amplificada por método PCR. Para ello se requiere una etapa previa, donde se sintetiza un DNA complementario (c-DNA) al RNA de interés mediante una enzima Transcriptasa Reversa.

Etapas RNA - PCR

Obtención células o tejidos de interés

Obtención RNA

Síntesis de c-DNA

Amplificación de secuencia de c-DNA por P.C.R.

Ventajas RNA-PCR:

No interferencia Secuencias INTRON
RNA blanco rápidamente amplificado
Análisis es en genes activos
Permite analizar Virus RNA (Hepatitis C).

Desventajas RNA-PCR:

RNA extremadamente lábil
Requiere paso enzimático adicional.

4.- DETECCION DE RNA VIRAL DE VHC POR PCR

Considerando los bajos niveles de virus VHC circulante en los pacientes infectados, el uso de PCR para la detección de RNA viral, en sangre e hígado de estos pacientes, ha sido de gran ayuda para el mayor conocimiento de esta infección.

Este método altamente sensible ha permitido:

- Detectar RNA viral circulante tempranamente post-infección (días), semanas antes de la elevación de enzimas ALT y de la aparición de niveles de anticuerpos anti-VHC detectables ^(5,6).
- Entregar información sobre el estado de viremia en los casos anti-VHC positivo con función hepática normal ⁽⁷⁾.
- Evaluar la eficacia o respuesta a tratamientos, por ej. interferon alfa ⁽⁸⁾.
- Realizar estudios de seguimiento para evaluar la viremia en pacientes con Hepatitis Aguda y Crónica ⁽⁹⁾.
- Diagnosticar la infección por VHC en pacientes con Hepatitis Crónica NoA - NoB - seronegativos ⁽¹⁰⁾.
- Estudiar la transmisión vertical de VHC.
- Evaluar la sensibilidad y especificidad de ensayos serológicos disponibles.

5.- FACTORES IMPORTANTES DE CONSIDERAR EN EL USO DE P.C.R.

a) Diversidad del Virus VHC

Existe una gran cantidad de información acerca de las secuencias nucleotídicas de los diferentes aislados de VHC (americanos, japoneses, europeos). Se han descrito diferencias variables en las secuencias nucleotídicas y de polipéptidos en las regiones NS-3, NS-4, NS-5 y regiones de envoltura de los diferentes aislados, confirmando que existen **múltiples tipos de HCV**.

La región más conservada entre todos los aislados de VHC corresponde a una región del extremo 5 Terminal que codifica para las proteínas de la nucleocápside viral ^(11,12).

b) Selección de Primers

Múltiples primers (oligonucleótidos) han sido probados en los diferentes aislados de VHC, a la fecha descritos.

Está claro, actualmente, que los primers a usar en la detección de VHC deben ser diseñados específicamente para la región 5 terminal (ó 5 no codante) del genoma, ya que esta región está altamente conservada entre los diferentes aislados y excluye la posibilidad de no detectar la viremia debido a la heterogenicidad de las secuencias ^(6,12,13).

6.- USO DE NESTED P.C.R. (P.C.R. anidada)

Método de PCR descrito por Okamoto y col. que permite aumentar la sensibilidad y especificidad en la detección de VHC-RNA. Consiste en la realización de 2 amplificaciones sucesivas, donde los productos específicos de la primera amplificación se utilizan para una segunda amplificación con primers específicos ⁽¹⁴⁾.

Este método ha permitido detectar el RNA viral en más del 90% de los pacientes con Hepatitis Crónica NoA-NoB (92% en seronegativos, 100% en pacientes anti-VHC positivos).

La combinación de Nested PCR y primers específicos derivados de la región 5 no-codante parecería tener una sensibilidad y especificidad similar a la obtenida a través de una PCR única e hibridación con sondas específicas ^(15,16,17).

7.- LIMITACIONES EN LA INTERPRETACION DE RESULTADOS

- Por su extrema sensibilidad, PCR puede detectar mínimas cantidades de contaminación (falsos positivos).
- No permite obtener resultados cuantitativos reproducibles.
- Inadecuada recolección y conservación de muestras puede dar resultados falsamente negativos.
- Un resultado negativo por PCR indica ausencia de viremia y no descarta una infección por VHC.

REFERENCIAS

- 1) Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a Polymerase Catalysed Chain Reaction. *Methods in Enzymology*. Vol 155, 1987.
- 2) Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, et al. Enzymatic Amplification of B-Globin Genomic Sequences and restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 1985 Vol 230: 1350-54.
- 3) Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, et al. Primer-directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-491.

- 4) Christian Brechot.
Polymerase Chain Reaction. A new tool for the study of viral infections in hepatology. *Journ of Hepatology* 1990; 11: 124-129.
- 5) Shimizu YK, Weiner AJ, Rosenblatt J, et al.
Early events in Hepatitis C Virus infection in chimpanzees.
Proc Natl Acad Sci. USA 1990; 87: 6441-6444.
- 6) Garson JA, Ring C, Tuke P, Tedder RS.
Enhanced detection by PCR of hepatitis C Virus RNA.
Lancet 1990; 336: 878-879.
- 7) Garson JA, Tuke PW, Makris M, Briggs M, et al.
Demonstration of viraemia patterns in haemophiliacs treated with hepatitis C Virus contaminated factor VIII concentrates.
Lancet 1990; 336: 1022-1025.
- 8) Kanai K, Iwata K, Nakao K, Kako M, et al.
Suppression of hepatitis C Virus RNA by Interferon &.
Lancet 1990; 336: 245.
- 9) Weiner AJ, Truett MA, Rosenblatt J, et al.
HCV testing in low risk population.
Lancet 1990; 336: 695
- 10) Weiner AJ, Kuo G, Bradley SW, Bonino F, et al.
Detection of hepatitis C Viral sequences in NonA-NonB hepatitis.
Lancet 1990; 335: 1-3
- 11) Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, et al.
Molecular biology of the Hepatitis C Viruses: Implications for diagnosis, development and control of Viral diseases.
Hepatology 1991; 14: (2) 381-388).
- 12) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, et al.
The 5 terminal sequence of the hepatitis C Virus genome.
Jpn J Exp Med 1991; 60: 167-177.
- 13) Han JH, Shyamala V, Richman KH, et al.
Characterization of the terminal region of the Hepatitis C in the 5 untranslated region and poly (A) tails at the 3 end.
Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 1711-1715.
- 14) Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, Tanaka T, et al.
Detection of Hepatitis C Virus RNA by a two stage Polymerase Chain Reaction with two pairs of Primers deduced from the 5 non coding Region.
Jpn J Exp Med 1990; 60: 215-222.
- 15) Christiano K, Baker B, Di Bisceglia A, et al.
Detection of HCV RNA by the Polymerase Chain Reaction.
Viral Hepatitis and Liver Disease. 1991. William & Wilkins Baltimore p 374-376.
- 16) Gretch DR, Wilson JJ, Carithers RL, et al.
Detection of Hepatitis C Virus RNA: Comparison of one stage Polymerase Chain Reaction (PCR) with Nested, Set PCR.
Journal of Clinical Microb 1993; 31: pg 289-291.
- 17) Garson JA, Tedder RS, Briggs M, et al.
Detection of Hepatitis C Viral Sequences in blood donations by Nested Polymerase Chain Reaction and prediction of infectivity.,
Lancet 1990; 335: 1419-1422.

SUMMARY:

This article analyses the diagnosis uses of CHV detection, using the CRP method and considers its values and limitations.