

Importancia de la RT-PCR Cualitativa en la Evidencia Directa de la Viremia Activa del Virus de la Hepatitis C

Autores: Dres. Guerrero Alva Ivonne,
Mejía Farro Roberto, Burneo Valderrama
Jaime, Quispe Huamanquispe Dora,
Galarza Pérez Marco

Laboratorio de Investigación y
Diagnóstico Molecular Oncológico
MAMLAB – Lima Perú

ARTÍCULO ORIGINAL

RESUMEN

El Virus de la Hepatitis C (VHC), asociado a cronicidad y a carcinoma hepatocelular (CHC), es la mayor causa de hepatitis parenteral no-A, no-B. La infección por VHC es usualmente diagnosticada por pruebas que detectan anticuerpos circulantes para antígenos VHC, reflejando la respuesta inmune sin indicar la viremia activa.

Objetivo: detectar viremia activa del VHC, en individuos con o sin antecedentes de exposición a factores de riesgo conocidos (EFRC), empleando la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa (RT-PCRc).

Material y Método: se estudiaron seis muestras de sangre periférica, de individuos con EFRC y 6 sin EFRC. Se extrajo ARN de cada muestra la cual fue sometida a síntesis de ADNc y posterior amplificación in vitro de un segmento génico viral – VHC con RT-PCRc .

Resultado: En 5/6 (83.3%) casos con EFRC se detectó viremia, 2/5 de ellos fueron sero-negativos. En 2/6 (33.3 %) casos sero negativos sin EFRC la RT-PCRc fue positiva para ARN - VHC.

Conclusión: la sensibilidad de la prueba molecular cualitativa nos permitió detectar en individuos sero-positivos y sero-negativos con EFRC a aquellos con viremia activa e identificar en aquellos sin EFRC y serología negativa a individuos con infección oculta, portadores asintomáticos, aparentemente sanos.

Palabras claves: Hepatitis C, Viremia

ABSTRACT

The hepatitis C virus (HCV) is associate to chronic and hepatocelular carcinoma (HCC), is the main cause of parenteral non-A, non-B hepatitis.

The infection by HCV is usually evaluated by test that detecting circulating antibodies for HCV antigens, reflecting immunology response without indicate active viraemia.

Objective: to detect active viraemia, in individual person with or without antecedents of exposition to risk factors known (EFRC), applying the qualitative polymerase chain reaction (RT-PCRc).

Material and Method: were studied 6 blood samples, from individual persons with EFRC and 6 without EFRC. Was extracted RNA of each sample and submit to synthesis of cDNA and posterior in vitro amplification of one HCV viral genomic segment with qualitative RT-PCR.

Results: In 5/6 (83.3%) cases with EFRC were detected viraemia, 2/5 of them were sero-negatives. In 2/6 (33.3%) cases sero-negatives without EFRC the TR-PCRc was positive for HCV-RNA.

Conclusion: the sensibility of the qualitative molecular test permitted to detect in individual persons sera-positives and sera-negatives with EFRC to those with active viraemia and identified in those without EFRC and negative serology to individual persons with occult infection, carriers a symptomatic apparently healthy.

Key words: Hepatitis C, Viremia

INTRODUCCIÓN

Los intentos para identificar al agente de las hepatitis no-A y no-B fueron un fracaso hasta que los métodos de biología molecular facilitaron la clonación de una secuencia de un pequeño virus ARN de filamento positivo (4) llamado Virus de la Hepatitis C (VHC) en el año 1988. Este virus VHC, es miembro de la familia Flaviviridae, de aproximadamente 9.4 Kb, codifica una poli proteína de 3,010 aminoácidos, de transmisión parenteral asociado a cronicidad (21) y a carcinoma hepatocelular (CHC) (23) y es considerado como la mayor causa de hepatitis parenteral no-A, no-B, también se le ha reportado en linfomas no Hodgkin aunque su rol patológico aún no se ha determinado (15, 20).

En el país han sido estudiadas las infecciones bacterianas frecuentes en pacientes cirróticos (3) y la sero-prevalencia de anticuerpos VHC estudiada en una población de la selva norte cuyos resultados fueron muy diferentes a los de VHB (22).

Las vías de contagio mejor conocidas del VHC son la parenteral a través del empleo de agujas compartidas por los toxicómanos, administración de productos sanguíneos o la manipulación de sangre y/o sus productos contaminados, o mediante relaciones sexuales sin protección o intervenciones quirúrgicas (5), sin embargo las investigaciones hasta el momento han identificado otras nuevas rutas de riesgo para adquirir la infección como es a través de la piel sana, del sudor y de la saliva de portadores en cuyo material biológico también se ha detectado el genoma viral. (16, 12). El periodo de incubación reportado para la hepatitis C, oscila entre 2 a 26 semanas,

La infección por VHC es usualmente diagnosticada por una serie de pruebas serológicas que facilitan la determinación de anticuerpos circulantes contra las proteínas estructurales y no estructurales (25, 1, 10), las cuales reflejan sólo la respuesta inmune sin indicar la viremia activa y los casos positivos se confirman con el uso del método de PCR el cual se aplica también para valorar la respuesta al tratamiento.

El ARN del VHC, detectado por RT-PCR, puede proporcionar una detección no cuantitativa de viremia activa (26) y se le considera como la mejor prueba para predecir por sí sola la infectividad (6), por otro lado la semi-cuantificación por RT-PCR competitiva hasta el momento por su costo se hace inaccesible (8) teniendo en consideración que durante el tratamiento del paciente es necesario realizar varias veces esta evaluación.

Actualmente, los métodos de diagnóstico son más sensibles (9) y específicos que a inicios de los noventa, siendo la PCR capaz de detectar una partícula viral en 10⁶ células sanas.

El objetivo del estudio fue detectar viremia activa del VHC, en individuos con y sin antecedentes de exposición a factores de riesgo conocidos (EFRC), empleando la reacción en cadena de la polimerasa cualitativa (RT-PCR).

MATERIAL Y MÉTODO

Se ha investigado viremia activa del VHC en 6 pacientes con EFRC, 4 con anticuerpos anti - VHC y 2 inmuno-negativos y 6 pacientes inmuno negativos sin EFRC, Tabla 1; procedentes del área urbana de Lima, empleando RT-PCR.

Material biológico.- Se recibió en un tubo con anticoagulante EDTA, 4 cc de sangre periférica de cada uno de los pacientes, las cuales fueron manipuladas con estrictas medidas de bioseguridad, se trabajó solo una muestra a la vez con exposición de luz UV antes y después de proceder con cada caso.

Tabla 1. Casos con y sin EFRC vs ARN-VHC

Caso	Anti-VHC	EFRC	RT-PCRc ARN-VHC
01	-	con	+
02	+	con	+
03	-	con	+
04	+	con	-
05	+	con	+
06	+	con	+
07	-	sin	-
08	-	sin	+
09	-	sin	-
10	-	sin	-
11	-	sin	-
12	-	sin	+

EFRC: exposición a factores de riesgo conocidos

Se procedió a la separación de las células mononucleares con gradientes de ficol y se mantuvieron en guanidino a -20° C hasta el estudio molecular.

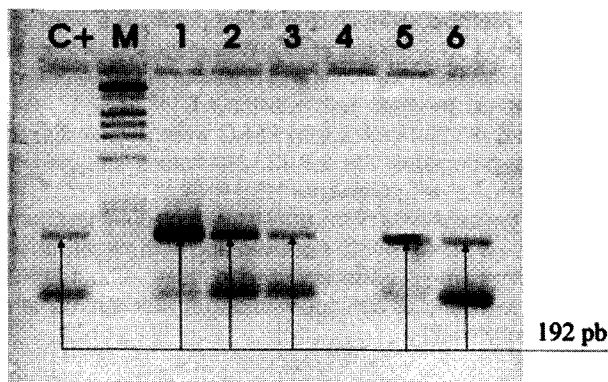
Análisis molecular - Reacción en cadena de la polimerasa.- El ARN de cada una de las muestras fue extractado y sometido a transcripción reversa (7, 4), el ADNc fue amplificado empleando cebadores (Gen Bank HCV 5UTR) y Taq Gold AB. Posteriormente sometido a una estrategia de amplificación de 40 ciclos: 94° C durante 30 segundos, 56° C por 30 segundos y 72° C por 1 minuto en un TC 2400 AB.

Análisis electroforético.- Los amplicones obtenidos en cada caso fueron sometidos a un corrido sobre geles de agarosa al 3%. Los casos positivos mostraron una talla correspondiente a 192 pares de bases (pb) con respecto al marcador de peso molecular de ADN empleado (Φ 174X DNA). Paralelamente se procedió con controles blancos de rigurosidad en cada fase del estudio y controles comerciales positivo y negativo de referencia.

RESULTADOS

En el 58.3 % de los casos estudiados (7/12) se observó VHC Tabla 2.. En 5/6 (83.3%) casos con EFRC se detectó viremia activa, Figura 1, 2/5 de ellos sero-negativos. En 2/6 (33.3 %) casos sero-negativos sin EFRC la RT-PCRc fue positiva para ARN - VHC, Figura 2.

FIGURA 1. Talla de 192 pb correspondiente al ARN-VHC en los casos con EFRC.



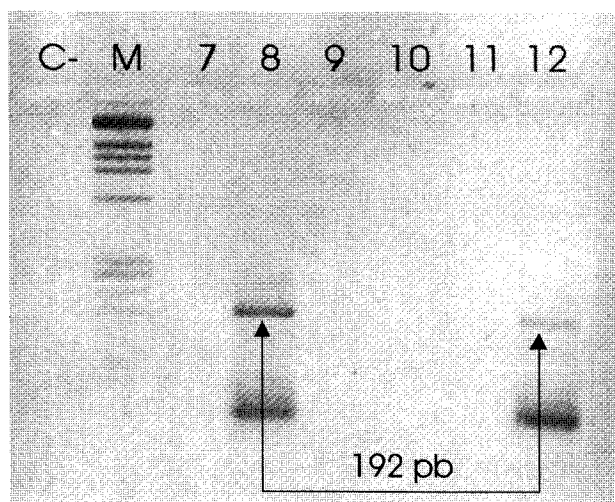
C+: control positivo, M: marcador de peso molecular Φ 174X DNA, 1-3 y 5-6: casos positivos, 4: caso negativo

Tabla 2. Frecuencia del VHC detectado por RT-PCRc.

	Nº Casos	Casos + PCR	%
Con y Sin EFRC	12	7	58.3
Con EFRC	6	5	83.3
Sin EFRC	6	2	33.3

EFRC: exposición a factores de riesgo conocidos

FIGURA 2. Talla de 192 pb correspondiente al ARN-VHC en los casos sin EFRC.



C-: control negativo, M: marcador de peso molecular [] 174X DNA, pozos 8 y 12: casos positivos

DISCUSIÓN

La hepatitis C constituye un grave problema de salud pública que afecta a más de 170 millones de personas en todo el mundo pudiendo llegar a ser crónica y mortal. Según la Organización Mundial de la Salud la tasa de prevalencia en donantes de sangre sanos va de 0,01 % a 0,02% en el Reino Unido y norte de Europa, de 1% a 1,5% en Europa del sur y 6,5% en la parte ecuatorial de África (17).

El virus de la hepatitis C es uno de los microorganismos patógenos que puede ser transmitido en condiciones no asépticas (11). Se transmite a través de la sangre infectada y con menor frecuencia a través de las secreciones contaminadas (semen, flujo vaginal, etc.). Por ello el mayor riesgo lo tienen aquellas personas expuestas con gran frecuencia a los factores sangre y secreciones contaminadas como el grupo de pacientes con EFRC de nuestro estudio (transfusiones, drogadicción, relaciones sexuales sin protección, trabajadores de la salud, receptores de órganos transplantados, diálisis renal, de madre a hijo durante el embarazo, procedimientos quirúrgicos, etc). Lo preocupante de este tipo de hepatitis es que más del 80 % de los pacientes infectados desarrollan hepatitis crónica y de ellos más del 20% progresan a cirrosis hepática y posteriormente a cáncer hepático (13).

Nosotros observamos que las muestras de sangre negativas para marcadores serológicos VHC correspondientes a pacientes con EFRC, todavía contienen partículas virales infecciosas, que pueden ser identificadas por RT-PCRc y nos indican la per-

sistencia del ARN viral "viremia" con evasión de la respuesta inmune, además de, validar la respuesta al tratamiento viral al que fueron sometidos y contribuir con la decisión al tratamiento. El valor de la variante de la PCR que empleamos mediante la cual detectamos directamente la presencia de secuencias de ARN-VHC en las células mononucleares de las muestras estudiadas, está dada por los portadores asintomáticos aparentemente ya curados que reportamos. Hallazgo que concuerda con el reportado por Thiers para VHB cuando demostró que la sangre negativa para todos los marcadores serológicos puede también inducir infección VHB, concluyendo entonces que los sujetos portadores de carga viral con serología negativa pueden ser identificados como tal con un análisis de PCR cualitativo (24).

A nivel mundial ha sido reportado que existen personas sanas portadoras crónicas del virus C (19, 2) aunque ya se conoce que la mayoría de las infecciones evolucionan a una enfermedad crónica que puede permanecer latente durante años hasta que aparecen sus primeros síntomas, consiguiendo que el sistema inmunológico en un 15% de los casos logre eludir el efecto viral.

El VHC es reconocido también como uno de los virus involucrados en la cascada carcinogénica para la generación de CHC, y aunque no posee oncogenes reconocidos específicamente en su genoma, la generación de CHC ocurre en la mayoría de los casos como consecuencia y posterior a la cirrosis hepática cualquiera sea su etiología, sin embargo algunas de sus proteínas virales podrían estar involucradas con funciones trans-activadoras de genes celulares o alterarían el equilibrio celular por vías biológicas aún no definidas lo cual sería uno de los condicionantes que contribuyan con la transformación maligna del hepatocito por lo que resulta imperioso la prevención temprana de esta infección con la utilización de la tecnología de punta que identifique viremia activa como lo observado en nuestra casuística.

La gran sensibilidad de la RT-PCR empleada como herramienta molecular cualitativa nos ha facilitado mediante la identificación de portadores silenciosos aparentemente asintomáticos de viremia activa ARN-VHC, prevenir en ellos un daño hepático mayor, como los casos sin EFRC quienes tuvieron estudios serológicos negativos, anecdóticamente ellos comentaron acudir al gimnasio con frecuencia y haber compartido toallas y/o recipientes de bebidas con "amistades aparentemente sanas con historia de hepatitis C curada", lo cual podría corresponder a formas de contagio menos conocidas mediante portadores de viremia activa oculta, vía las glándulas salivares caracterizadas por un tejido alternativo e intermedio entre el hígado y las células bucales o vía células epiteliales de la boca en las cuales el virus no solo las infecta sino que también tiene la capacidad de multiplicarse en ellas (16) por lo que inferimos que la exposición con saliva contaminada de las "amistades aparentemente sanas con historia de hepatitis C curada" a través de los recipientes compartidos sean botellas o vasos pudo haber sido la vía de contagio. Otra vía probable de contagio en estos pacientes, pudo haber sido a través de las células epiteliales de la piel donde se ha demostrado que el virus se multiplica y está activo, o a través de las glándulas sudoríparas y ser emitido al exterior mediante el sudor donde este patógeno puede sobrevivir y sus partículas virales pueden permanecer y ser detectadas en pacientes con infección activa como en pacientes asintomáticos con infección oculta (16, 12), considerando que

en nuestro grupo de pacientes un porcentaje de ellos reportó practicar gimnasia en establecimientos particulares lo cual los expone a factores de alto riesgo no conocidos como lo son el sudor y el contacto con la piel.

El estudio molecular del ARN – VHC es de gran utilidad considerando que el 90% de las personas infectadas no presentan síntomas, y que la hepatitis C se distingue por su persistencia, presentándose su evolución a fases crónicas de la enfermedad en más del 80% de los casos y solo el 10% de los pacientes manifiestan enfermedad aguda asociada a ictericia cuando adquieren la infección de VHC.

Los reportes indican que hasta el momento se pierde un número considerable de personas infectadas por el VHC con los métodos convencionales lo cual ha sido calculado por algunos investigadores en unas 85,000 personas como es el caso de España y en todo el mundo más de 29 millones. Esta es una epidemia silenciosa, el momento del contagio pasa desapercibido porque no se manifiestan síntomas y puede presentarse hasta 30 años después causando daño irreversible al hígado (10 , 14)

La importancia de nuestros resultados moleculares cualitativos se basan en la detección de la viremia activa mediante la identificación del ARN-VHC evitando el mayor peligro de la hepatitis C que constituye la cronicidad a la que llegue, a la fibrosis o en último grado a la cirrosis; curiosamente el peligro de este proceso no depende de la carga viral ni del tipo viral pero si de su detección molecular temprana para prevenir su asociación con otros cofactores de riesgo como la edad del individuo, la ingesta de alcohol la cual incrementa la replicación viral e incluso compromete la función inmune y amplifica el estrés oxidativo (18), la coinfección con otros virus (como pueden ser el VIH o el VHB) o el exceso de hierro que desencadenen la destrucción del hepatocito y que pueden ser controlados clínicamente.

Podemos afirmar que la importancia de un buen diagnóstico molecular se basa fundamentalmente en aplicar con estrictez las medidas de bioseguridad pertinentes a la manipulación de las muestras, corroborado por los controles de rigurosidad empleados, la obtención de un ARN altamente puro, el diseño de los cebadores, el empleo de controles positivos y negativos confiables, la sensibilidad y especificidad de la herramienta elegida como la RT-PCR para el estudio del ARN – VHC y una minuciosa y cuidadosa interpretación del análisis.

En conclusión, la sensibilidad de la prueba molecular cualitativa confirmó y detectó en individuos sero-positivos y sero-negativos con EFRC a aquellos con viremia activa, e identificó en aquellos sin EFRC y serología negativa a individuos con infección oculta, portadores aparentemente asintomáticos, evitándoles un daño hepático mayor contribuyendo con la decisión temprana al tratamiento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aach R, Stevens C, Hoilinger F, et al. Hepatitis C virus infection in post-transfusion hepatitis. An analysis with first and second-generation assays. *N Engl J Med* 1991; 325: 1325 – 1329.
2. Alter M, Krusson D, Nainan O, McQuillan G, Gao F, Moyer L, Kaslow R, Margolis H. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *The New Engl J Med* 199; 341: 556 – 562.
3. Cebrejos O, Lozano M., Vargas C. Infecciones en pacientes cirróticos en el Hospital Arzobispo Loayza en Lima – Perú. *Gastroenterol Per* 2000; 20(2): 146 – 151.
4. Choo Q, Kuo G, Weiner A, Overby L, Bradley D, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
5. Esteban J, Gómez J, Martell M et. Al. Transmission of hepatitis C virus by a cardiac surgeon. *N Engl J Med* 1996; 334: 555 – 560.
6. Garson J, Tedder R, Briggs M, Tuke P, Glazebrook J, Trute A, Parker D, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in blood donations by "nested" polymerase chain reaction and prediction of infectivity. 1990; 335: 1419 – 1422.
7. Guerrero I. Reordenamiento de genes BCR-ABL en el estudio de la biología molecular de la translocación t(9;22) en leucemia mieloide crónica. *Acta Cancerológica* 2002; XXXI (2): 15-21.
8. Gunji T, Kato N, Mori S, et al. Correlation between the serum level of hepatitis C virus RNA and disease activities in acute and chronic hepatitis C. *Int J Cancer* 1992; 52: 726-730.
9. Hijar G, Carrillo C, Padilla C, Cabezas C, Suarez M, Romero G, Montoya Y. Estandarización de la PCR para el diagnóstico del virus de la hepatitis B en el Perú. *Rev Med Exp. INS* 1988; XV(1/2): 30 – 33.
10. <http://www.aidsinonet.org/505e-hepatitis.html>
11. <http://www.dentalqb.com/paginas/esterilizacion.html>
12. <http://www.diariomedico.com>
13. <http://www.durand.org.ar/c.htm>
14. <http://www.ercilla.cl/nanterior/hepatitis.html>
15. <http://file://D:/evolution/HCV.poster.html>
16. <http://www.fehv.org/noticias.htm>
17. <http://www.fonendo.com.shtml>
18. http://www.lgbtcenters.org/news/news_item.asp
19. <http://www.msd-es.com>
20. <http://www.ucm.es/info/fmed/medicina.edu/infecciones/linfomas.htm>
21. <http://www.usc.es/spubl/29rodr-1.htm>
22. Hyams K, Phillips I, Moran A, Tejada A, Wignall F, Escamilla J, Naval Medical Research Institute Bethesda, Maryland. Seroprevalence of hepatitis C antibody in Peru. *J Med Virol* 1992; 37(2): 127 – 131.
23. Kew M, Houghton M, Choo Q, Kuo G. Hepatitis C virus antibodies in southern African blacks with hepatocellular carcinoma. 1990; 335: 873 – 874.
24. Thiers V, Kremsdorf D, Schellekens H, Gouldeal A, Sninsky J, et al. Transmission of the hepatitis B from hepatitis-B-seronegative subjects. 1988; 3:1273 – 1276.
25. Van Der Poel C, Cuipers H, Reesink H, et al. Confirmation of hepatitis C virus infection by new four antigen recombinant immunoblot assay. *Lancet* 1991; 337: 317 – 319.
26. Weiner A, Kuo G, Bradley D, et al. Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1990; 335: 1-3.