



REPÚBLICA DE CUBA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INMUNOENSAYO

***ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ENSAYOS MOLECULARES PARA LA
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN
SUERO Y PLASMA HUMANO***

Tesis presentada en opción al grado científico de ***Doctor en Ciencias de la Salud***

Lic. YAIMÉ JOSEFINA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

La Habana

2013



REPÚBLICA DE CUBA
CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CENTRO DE INMUNOENSAYO

***ESTANDARIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE ENSAYOS MOLECULARES PARA LA
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ARN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN
SUERO Y PLASMA HUMANO***

Tesis presentada en opción al grado científico de ***Doctor en Ciencias de la Salud***

Autor: Lic. YAIMÉ JOSEFINA GONZÁLEZ GONZÁLEZ

Tutores: Profesor Titular Eduardo Pentón Arias, Dr.C.

Investigador Titular Santiago Dueñas Carrera, Dr.C.

Asesora: Investigadora Titular Yamile González González, Dr.C.

La Habana

2013

“El pueblo más feliz es el que tenga mejor educado a sus hijos, en la instrucción del pensamiento, y en la dirección de los sentimientos.

Un pueblo instruido ama el trabajo y sabe sacar provecho de él.

*Un pueblo virtuoso vive más feliz y más rico que otro lleno de vicios,
y se defenderá mejor de todo ataque”.*

José Martí.

A mis Abuelos,

A mis Padres y Hermanos,

A mis amados Hijos.

SÍNTESIS

Hasta el año 2002, Cuba no contaba con un ensayo confirmatorio de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC), ni era posible cuantificar su carga viral para el seguimiento de pacientes bajo tratamiento, debido a los precios elevados de dichos ensayos en el mercado internacional. El objetivo de este trabajo consiste en estandarizar y evaluar dos ensayos moleculares: cualitativo y cuantitativo, soportados en el Sistema Ultramicroanalítico (SUMA), con reactivos y tecnología propios, factibles de insertarse en nuestro sistema de salud de forma estable y sostenible.

La novedad de esta tesis radica en: estandarización de nuevas condiciones de extracción del ARN del VHC a partir de suero y plasma humano, diseño de cebadores y sondas no descritos en la bibliografía, síntesis de nuevos transcritos e hibridación de ADN amplificado mediante el SUMA. Los ensayos UMELOSA® HCV CUALITATIVO y UMELOSA® VHC CUANTITATIVO para detección y cuantificación del VHC, respectivamente, cumplen con los requerimientos analíticos internacionales establecidos y fueron registrados en el CECMED en 2002 y 2010.

Desde 2005, el ensayo cualitativo ha sido utilizado para confirmar y monitorizar el tratamiento de seropositivos al VHC, al virus de la inmunodeficiencia humana y hemodializados, para la evaluación de órganos del Programa Nacional de Trasplantes y de candidatos vacunales preventivos y terapéuticos contra el VHC, aspectos que aportan novedad científica e impacto social.

Ambos ensayos son los primeros de su tipo desarrollados, registrados y aplicados en Cuba y constituyen guías metodológicas para el desarrollo y producción de otros ensayos moleculares.

GLOSARIO

5' NC: 5' No Codificante

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia o complementario

Agua libre de RNAsas: Agua libre de ribonucleasas

ALT: alanina aminotransferasa

AMV: Virus de la Mieloblastosis Aviar

Anti-VHC: Anticuerpos contra el VHC

ARN: Ácido ribonucleico

ARNh: ARN heterólogo

b: Pendiente de la recta de regresión lineal

bDNA: ADN ramificado, del inglés, *branched DNA*

CC: Control de Calidad

CECMED: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

CN: Control Negativo

CP: Control Positivo

CPDA-1: Anticoagulante de citrato, fosfato, y adenina

CV: Carga viral

CVar: Coeficiente de variación

dNTPs: Mezcla equimolar de trifosfatos de deoxinucleótidos de adenina, timina, guanina y citosina

E/FA: Estreptavidina- Fosfatasa Alcalina

EDTA: Sal disódica del ácido etilendiamino-tetracético

EI: Estándar Interno

EIA: Enzimoimmunoensayos, del inglés, *Enzyme-Immunoassay*

ELISA: Ensayo de inmunoabsorbente unido a enzima, del inglés, *Enzyme- Linked Immuno-Sorbent Assay*

ELOSA: Ensayo de oligoabsorbente unido a enzima, del inglés, *Enzyme-Linked Oligo-Sorbent Assay*

ERS: Estándar de Referencia Secundario

FA: Fosfatasa Alcalina

HTLV I y II: Virus linfotrópico de los leucocitos T humano I y II

IC: Intervalo de confianza

IFN: Interferón

IFN α -peg: Interferón α -pegilado

IFN- λ 3: Interferón lambda 3.

IgG: Inmunoglobulina G humana

IgM: Inmunoglobulina M humana

IL-28B: Interleucina o interleuquina 28B

IRES: Sitio de reconocimiento ribosomal, *Internal Ribosomal Entry Site*

kb: Kilobases

LD: Límite de detección al 95 %

LIA: Ensayo inmunoblot lineal, del inglés, *Linear Immuno Blotting Assay*

Log: Logaritmo decimal

MAO: Método de amplificación optimizado

MAR: Método de amplificación de referencia

MEO: Método de extracción optimizado

MER: Método de extracción de referencia

min: Minutos

NAT: Técnica de Amplificación de Ácidos Nucleicos, del inglés *Nucleic Acid Amplification Technique*

ND: No detectable

NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b: Proteínas no estructurales del VHC

nt: Nucleótidos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*

p/v: Relación peso a volumen

RBV: Ribavirina

RC: Control de Corrida, del inglés *Run Control*

RIBA: Ensayo inmunoblot recombinante, del inglés, *Recombinant Immuno Blotting Assay*

RLP: Regresión Lineal Ponderada

RNasas: Ribonucleasas

RNC: Región No Codificante del genoma del VHC

RT-PCR: Reverso Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés *Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*

RVS: Respuesta virológica sostenida

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple, del inglés, *Single-Nucleotide Polymorphism*

SUMA: Sistema Ultra Micro Analítico

TA: Temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)

Taq polimerasa: Polimerasa de *Thermus aquaticus*

TL: Tampón de lisis y solución estabilizadora de ácidos nucleicos

T_m: Temperatura de hibridación o fusión de cebadores, del inglés, *melting temperature*

TMA: Amplificación Mediada por Transcripción, del inglés, *Transcription Mediated Amplification*

UF: Unidades de fluorescencia

UI/mL: Unidades Internacionales por mL de suero o plasma.

UMELISA: Ultramicro ELISA

UMELOSA: Ultramicro ELOSA

VHA: Virus de la hepatitis A

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

v/v: Relación volumen a volumen

TABLA DE CONTENIDOS	Pág.
<i>SÍNTESIS</i>	
<i>GLOSARIO</i>	
<i>TABLA DE CONTENIDOS</i>	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	8
1.1. El virus de la hepatitis C: estructura y características	8
1.2. Variabilidad del VHC	9
1.3. Epidemiología	12
1.4. Historia natural	13
1.5. Tratamientos	14
1.6. Diagnóstico del virus de la hepatitis C	16
1.6.1. Ensayos indirectos	16
1.6.1.1. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	17
1.6.1.2. Ensayos de confirmación de anticuerpos (RIBA- LIA)	17
1.6.1.3. Detección de anticuerpos IgM anti-Core VHC	18
1.6.2. Ensayos directos	19
1.6.2.1. Ensayos para la detección del antígeno de la nucleocápsida del VHC	19
-1.6.2.2. Técnicas para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos	20
1.6.2.2.1. Técnica de amplificación de la señal	20
1.6.2.2.2. Técnicas de amplificación del blanco	21
1.6.2.3. Generalidades sobre técnicas cualitativas para la detección del ARN del VHC	26
1.6.2.4. Generalidades sobre técnicas cuantitativas para determinar de la carga viral del VHC	27
1.6.2.5. Determinación del genotipo del VHC	30
1.6.2.6. Determinación del ARN del VHC por RT-PCR	30
1.6.2.6.1. Métodos de extracción del ARN viral	31
1.6.2.6.2. Métodos de amplificación del ADN complementario	32
1.6.2.6.3. Estándares y controles en los ensayos que cuantifican el ARN del VHC	33
1.6.2.6.4. Hibridación de ácidos nucleicos en fase sólida	34
1.6.3. Tecnología SUMA	35
1.7. Validación de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos	35
1.7.1. Desempeño de los ensayos cualitativos (Regulación no. 47, CECMED, 2007)	35
1.7.2. Desempeño de los ensayos cuantitativos (Regulación No. 47, CECMED, 2007)	37
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	38

2.1.	Materiales	38
2.1.1.	Controles y materiales de referencia	38
2.1.2.	Muestras	39
2.1.3.	Equipos	40
2.1.4.	Diseño y síntesis de oligonucleótidos cebadores	41
2.1.5.	Sondas de captura diseñadas para la hibridación por el SUMA	41
2.1.6.	Plásmidos para la Transcripción in vitro de ARN con secuencia de VHC y del EI	42
2.2.	Métodos generales	42
2.2.1.	Procedimientos para la toma de suero o plasma humano	42
2.2.2.	Ensayo diagnóstico UMELISA® HCV (3 ^{ra} generación)	42
2.2.3.	Ensayos de referencia "Estándar de Oro"	43
2.2.4.	Electroforesis en gel de agarosa	43
2.2.5.	Métodos de extracción del ARN del VHC a partir de suero y plasma humano	44
2.2.6.	Métodos de amplificación	45
2.2.6.1.	Métodos de amplificación del ensayo cualitativo: RT-PCR y PCR anidada	45
2.2.6.2.	Diseño del cebador VHC 12n y evaluación de la sensibilidad para los genotipos 1 y 3	47
2.2.6.2.1.	Evaluación de la sensibilidad de los cebadores comerciales de la RT-PCR	47
2.2.6.2.2.	Diseño del nuevo cebador VHC 12n	47
2.2.6.2.3.	Comparación de los cebadores HCV01V-II y VHC 12n para los genotipos 1 y 3	47
2.2.6.3.	Amplificación del ensayo cuantitativo: RT-PCR competitiva	48
2.2.6.3.1.	Selección de la concentración óptima de los cebadores Q1 y Q2	48
2.2.6.3.2.	Preparación de los transcritos de VHC y EI	48
2.2.6.3.3.	Determinación de la concentración óptima de competencia del transcrito EI	49
2.2.7.	Método de detección cualitativa (MDC) del ARN del VHC mediante el SUMA	50
2.2.7.1.	Selección de la sonda de captura para el recubrimiento de las placas	51
2.2.7.2.	Selección de la concentración óptima de la sonda de captura	52
2.2.7.3.	Composición del estuche de reactivos del UMELOSA® HCV CUALITATIVO	52
2.2.7.4.	Interpretación de los resultados del UMELOSA® HCV CUALITATIVO	52
2.2.8.	Método de detección cuantitativa (MDQ) del ARN del VHC mediante el SUMA	53
2.2.8.1.	Selección de la concentración óptima de las sondas de captura Q5-NH ₂ y S1-NH ₂	54
2.2.8.2.	Composición del estuche de reactivos UMELOSA® VHC CUANTITATIVO	55
2.2.8.3.	Algoritmo de cuantificación del VHC	55
2.2.8.4.	Interpretación de los resultados del UMELOSA® HCV CUANTITATIVO	55

2.2.9.	Validación de los ensayos cualitativos y cuantitativos para suero y plasma	56
2.2.9.1.	Especificidad Clínica	56
2.2.9.2.	Especificidad Analítica o Reactividad cruzada	57
2.2.9.3.	Sensibilidad, Especificidad y Exactitud Genotípica para ambos ensayos	57
2.2.9.4.	Sensibilidad Analítica o límite de detección al 95%	57
2.2.9.5.	Robustez	58
2.2.9.6.	Comparación entre el UMELISA® HCV y UMELOSA® HCV CUALITATIVO	58
2.2.9.7.	Exactitud frente al Estándar Internacional de ARN del VHC 96/798	58
2.2.9.8.	Rango lineal de la curva de cuantificación de ARN del VHC	58
2.2.9.9.	Precisión o reproducibilidad intraensayo e interensayo	59
2.2.9.10.	Evaluación de cada ensayo frente a su homólogo comercial	59
2.3.	Aspectos éticos de la investigación	59
2.4.	Procesamiento estadístico de los resultados	59
2.5.	Análisis económico de la factibilidad de producción de ambos estuches	60
2.6.	Diagrama de flujo	61
CAPÍTULO 3: RESULTADOS		62
3.1.	Estandarización de un ensayo molecular para la detección del ARN del VHC	62
3.1.1.	Determinación de las condiciones óptimas de extracción del ARN del VHC	62
3.1.2.	Determinación de las condiciones óptimas de amplificación del ARN extraído	63
3.1.2.1.	Diseño del cebador VHC 12n y evaluación de la sensibilidad para los genotipos 1 y 3	64
3.1.2.1.1.	Evaluación de los cebadores comerciales para la RT-PCR del VHC	64
3.1.2.1.2.	Diseño del nuevo cebador VHC 12n y comparación con el HCV01V-II	65
3.1.2.1.3.	Evaluación de la sensibilidad para los genotipos 1 y 3	67
3.1.3.	Método de detección cualitativa (MDC) mediante la tecnología SUMA	68
3.1.3.1.	Selección de la sonda de captura para el recubrimiento de las placas	68
3.1.3.2.	Selección de la concentración óptima de la sonda de captura	69
3.2.	Evaluación del ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO	70
3.2.1.	Especificidad clínica	70
3.2.2.	Validación del tipo de muestra indicado para la prueba	71
3.2.3.	Sensibilidad analítica	71
3.2.4.	Especificidad Analítica o Reactividad cruzada	72
3.2.5.	Robustez	72
3.2.6.	Concordancia entre el UMELISA HCV y el UMELOSA® HCV CUALITATIVO	73

3.2.7.	Comparación del UMELOSA® HCV CUALITATIVO vs AMPLICOR® HCV Test, v 2.0	73
3.3.	Estandarización de un ensayo para la cuantificación del ARN del VHC	73
3.3.1.	Determinación de las condiciones de extracción	73
3.3.2.	Determinación de las condiciones óptimas de amplificación	74
3.3.2.1.	Selección de la concentración óptima de los cebadores Q1 y Q2	74
3.3.3.	Preparación de los transcritos de VHC y EI	74
3.3.3.1.	Síntesis de los ARN sintéticos de VHC y EI por el método de transcripción in vitro	74
3.3.3.2.	Determinación de la concentración óptima de competencia del EI	75
3.3.4.-	Método de detección cuantitativa (MDQ) mediante la tecnología SUMA	75
3.3.4.1.	Selección de la concentración óptima de las sondas de captura Q5-NH ₂ y S1-NH ₂	75
3.4.	Evaluación del ensayo UMELOSA® VHC CUANTITATIVO	76
3.4.1.	Especificidad clínica	76
3.4.2.	Especificidad Analítica o Reactividad cruzada	76
3.4.3.	Especificidad y Sensibilidad Genotípica	76
3.4.4.	Exactitud del ensayo frente al IS de ARN del VHC 96/798	78
3.4.5.	Rango lineal del ensayo	79
3.4.6.	Sensibilidad o límite de detección al 95 % del ensayo	80
3.4.7.	Reproducibilidad	81
3.4.8.	Robustez	82
3.4.9.	Comparación con el estuche comercial AMPLICOR HCV MONITOR® v 2.0	83
3.5.	Análisis económico de la factibilidad de producción de ambos estuches	83
3.5.1.	Cálculo del costo de producción de los ensayos desarrollados	84
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN		86
CONCLUSIONES		102
RECOMENDACIONES		103
BIBLIOGRAFÍA		104
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR		122
ANEXOS		125

GLOSARIO

5' NC: 5' No Codificante

aa: Aminoácidos

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia o complementario

Agua libre de RNasas: Agua libre de ribonucleasas

ALT: alanina aminotransferasa

AMV: Virus de la Mieloblastosis Aviar

Anti-VHC: Anticuerpos contra el VHC

ARN: Ácido ribonucleico

ARNh: ARN heterólogo

b: Pendiente de la recta de regresión lineal

bDNA: ADN ramificado, del inglés, *branched DNA*

CC: Control de Calidad

CECMED: Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos

CN: Control Negativo

CP: Control Positivo

CPDA-1: Anticoagulante de citrato, fosfato, y adenina

CV: Carga viral

CVar: Coeficiente de variación

dNTPs: Mezcla equimolar de trifosfatos de deoxinucleótidos de adenina, timina, guanina y citosina

E/FA: Estreptavidina- Fosfatasa Alcalina

EDTA: Sal disódica del ácido etilendiamino-tetracético

EI: Estándar Interno

EIA: Enzimoimmunoensayos, del inglés, *Enzyme-Immunoassay*

ELISA: Ensayo de inmunoabsorbente unido a enzima, del inglés, *Enzyme- Linked Immuno-Sorbent Assay*

ELOSA: Ensayo de oligoabsorbente unido a enzima, del inglés, *Enzyme-Linked Oligo-Sorbent Assay*

ERS: Estándar de Referencia Secundario

FA: Fosfatasa Alcalina

HTLV I y II: Virus linfotrópico de los leucocitos T humano I y II

IC: Intervalo de confianza

IFN: Interferón

IFN α -peg: Interferón α -pegilado

IFN- λ 3: Interferón lambda 3.

IgG: Inmunoglobulina G humana

IgM: Inmunoglobulina M humana

IL-28B: Interleucina o interleuquina 28B

IRES: Sitio de reconocimiento ribosomal, *Internal Ribosomal Entry Site*

kb: Kilobases

LD: Límite de detección al 95 %

LIA: Ensayo inmunoblot lineal, del inglés, *Linear Immuno Blotting Assay*

Log: Logaritmo decimal

MAO: Método de amplificación optimizado

MAR: Método de amplificación de referencia

MEO: Método de extracción optimizado

MER: Método de extracción de referencia

min: Minutos

NAT: Técnica de Amplificación de Ácidos Nucleicos, del inglés *Nucleic Acid Amplification Technique*

ND: No detectable

NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b: Proteínas no estructurales del VHC

nt: Nucleótidos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés, *Polymerase Chain Reaction*

p/v: Relación peso a volumen

RBV: Ribavirina

RC: Control de Corrida, del inglés *Run Control*

RIBA: Ensayo inmunoblot recombinante, del inglés, *Recombinant Immuno Blotting Assay*

RLP: Regresión Lineal Ponderada

RNasas: Ribonucleasas

RNC: Región No Codificante del genoma del VHC

RT-PCR: Reverso Transcripción- Reacción en Cadena de la Polimerasa, del inglés *Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*

RVS: Respuesta virológica sostenida

SNP: Polimorfismo de nucleótido simple, del inglés, *Single-Nucleotide Polymorphism*

SUMA: Sistema Ultra Micro Analítico

TA: Temperatura ambiente (20 °C a 25 °C)

Taq polimerasa: Polimerasa de *Thermus aquaticus*

TL: Tampón de lisis y solución estabilizadora de ácidos nucleicos

Tm: Temperatura de hibridación o fusión de cebadores, del inglés, *melting temperature*

TMA: Amplificación Mediada por Transcripción, del inglés, *Transcription Mediated Amplification*

UF: Unidades de fluorescencia

UI/mL: Unidades Internacionales por mL de suero o plasma.

UMELISA: Ultramicro ELISA

UMELOSA: Ultramicro ELOSA

VHA: Virus de la hepatitis A

VHB: Virus de la hepatitis B

VHC: Virus de la hepatitis C

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

v/v: Relación volumen a volumen

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) constituye un grave problema de salud en el ámbito mundial. Datos estimados indican que aproximadamente 185 millones de personas (2,8 % de la población mundial) presentan anticuerpos anti-VHC y entre 3-4 millones de personas se infectan cada año, mientras que anualmente se producen más de 350 000 muertes por causas relacionadas a esta patología (Mohd *et al.*, 2012). La cirrosis hepática es el principal determinante de la morbilidad y la mortalidad asociada con la hepatitis C crónica y en una proporción significativa de los pacientes cirróticos se manifiesta el carcinoma hepatocelular en el transcurso del tiempo (Chevaliez y Pawlotsky, 2006; Ghany *et al.*, 2009).

En Cuba, se estima que el 0,8 % de la población de donantes de sangre posee anticuerpos positivos al VHC (TecnoSUMA, 2013). La cirrosis hepática constituye la décima causa de muerte en mujeres y la oncenava en hombres, en ello el VHC tiene un papel preponderante (Anuario Estadístico de Salud, 2013). Esto se debe a su elevada prevalencia en determinados grupos de riesgo pues, a pesar de aplicarse medidas preventivas como la pesquisa de la sangre y sus derivados con técnicas serológicas de elevada sensibilidad, disponibles en todo el país y la indicación de procedimientos para minimizar la transmisión en unidades especiales y al personal de salud, la infección sigue aumentando en determinados grupos, por ejemplo: hemofílicos (59 %), donantes por plasmaféresis (47 %), trasplantados (79,2 %), pacientes multitransfundidos (51,6 %), pacientes con enfermedades onco-hematológicas (19,5 %), pudiendo llegar hasta un 95,6 % de anti-VHC positivos en unidades de hemodiálisis (Ballester *et al.*, 2005). Además, en estudios a los seropositivos al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el 14,2 % de los adultos y el 10 % de los niños tienen anticuerpos al VHC (anti-VHC) positivos (Bello *et al.*, 2005; Bello *et al.*, 2010). Por otro lado, aunque se utilicen medicamentos antivirales, la respuesta virológica sostenida (RVS) a ellos es baja, además de los numerosos eventos adversos que producen. Por todo lo anterior se considera que el VHC constituye un grave problema de salud en nuestro país.

El VHC, miembro de la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus*, presenta un genoma constituido por una cadena simple, de polaridad positiva de ácido ribonucleico (ARN) de 9,6 kb que codifica para una poliproteína de alrededor de 3 000 aminoácidos (aa) (Choo *et al.*, 1989). La región no codificante (RNC) en el extremo 5'

es altamente conservada para todos los genotipos y resulta de gran utilidad para el diagnóstico molecular (Barba, 2008).

El VHC se transmite por vía parenteral y el uso de drogas, tanto intravenosas como intranasales, es el principal modo de transmisión a nivel mundial (Shepard, 2005).

De manera general, el VHC induce una respuesta inmune contra prácticamente todos los antígenos virales en los individuos infectados (Kim *et al.*, 2012). No obstante, existen numerosos mecanismos que median el escape del VHC de la respuesta inmune hospedera y, por tanto, garantizan la persistencia viral en la mayoría de los individuos infectados (Thimme *et al.*, 2012). El 80-90 % de los pacientes con el VHC desarrollan una infección crónica, la cual se define como la presencia de ARN viral por más de seis meses posteriores al contagio.

La terapia recomendada para el tratamiento de la infección crónica es la combinación de interferón α -pegilado (IFN α -peg) y ribavirina (RBV), con la reciente incorporación de Telaprevir o Boceprevir para infecciones con VHC de genotipo 1 como triple terapia (EMA, 2012a; EMA, 2012b). Sin embargo, esta combinación es efectiva solo entre un 40-80 % de los pacientes y presenta serios efectos secundarios que muchos pacientes no toleran (Ghany *et al.*, 2011).

Para realizar el diagnóstico virológico y el seguimiento de la infección por el VHC se utilizan dos tipos de ensayos: las pruebas indirectas y las directas (Bukh *et al.*, 1995). Las primeras son ensayos serológicos que detectan anticuerpos específicos a las proteínas del virus (anti-VHC). Su positividad indica que el paciente estuvo o está infectado con el virus, pero no confirma una infección activa. A partir de 1991, con el inicio de la pesquisa de anti-VHC en la mayoría de los países, la transmisión postransfusional disminuyó considerablemente (Poynard *et al.*, 2003). Desde la última década del siglo pasado se han desarrollado métodos de diagnóstico serológico con gran incremento de su sensibilidad y especificidad (Pawlotsky, 2002b). Las pruebas directas o moleculares pueden detectar, cuantificar y caracterizar los componentes de la partícula viral, como son el ARN viral y el antígeno de la nucleocápsida, por tanto, su positividad indica una infección activa. Estas pruebas resultan indispensables para la confirmación (ensayos cualitativos) y el monitoreo de la terapia antiviral (ensayos cuantitativos), por lo que son muy importantes para la toma de decisiones

terapéuticas (terapia guiada por la respuesta) y ofrecen un valor predictivo de la respuesta a la terapia (Pawlotsky, 2002b; Di Martino *et al.*, 2011).

En los años 80 de la pasada centuria, se desarrolló en Cuba una tecnología que permitía compatibilizar las necesidades de un sistema de salud altamente socializado con las posibilidades de un país en desarrollo (Fernández-Yero, 2009). El surgimiento del Sistema Ultra Micro Analítico (SUMA) y las técnicas de ultramicroELISA (UMELISA) permitieron trabajar con muy bajos volúmenes de muestras y reactivos por lo que se crearon y produjeron ensayos diagnósticos para la pesquisa masiva a muy bajo costo (Reed, 2009), dentro de ellos el estuche UMELISA HCV que detecta los anticuerpos anti-VHC en personas infectadas (Valdivia *et al.*, 2005). Este ensayo presenta el inconveniente de que no detecta aquellas personas en período de ventana inmunológica (70-90 días) o inmunodeprimidas (trasplantados, hemodializados y personas seropositivas al VIH) donde los títulos de anticuerpos son muy bajos. Por último, no es posible distinguir los individuos seropositivos con una infección activa, de aquellos que hayan tenido una remisión espontánea de la infección (cerca del 40 %, OMS, 2012) pues ambos presentan títulos elevados de anticuerpos. Esto hizo imprescindible la estandarización de ensayos moleculares factibles de insertarse en nuestro sistema nacional de salud de forma sustentable.

PROBLEMA:

Debido a que:

- La infección por el VHC es un grave problema de salud en el ámbito mundial y en Cuba ha mostrado una tendencia al aumento en los últimos años.
- El precio de los ensayos comerciales para confirmar la infección y monitorizar el tratamiento de estos pacientes sería alrededor de 4,6 millones de USD por año (sin incluir el costo de la terapia), cuantioso gasto que nuestro país no puede asumir.
- La no disponibilidad en Cuba de las pruebas para la caracterización clínica de los pacientes, implica un gran atraso en la práctica médica, ya que las guías terapéuticas a nivel mundial no se concibe un esquema de tratamiento sin pruebas moleculares.
- El diagnóstico inadecuado eleva el peligro de diseminación de la infección en la población porque se desconocen hasta en un 40 % las vías de trasmisión de la enfermedad.

Se planteó, a solicitud del Ministerio de Salud Pública, la necesidad de estandarizar, evaluar y registrar dos ensayos basados en el diagnóstico molecular del ARN del VHC, con la calidad analítica requerida, que permitieran la detección y cuantificación del virus en suero y plasma humano, soportados por la Tecnología SUMA de forma sustentable.

Dados estos antecedentes, se propuso la siguiente **HIPÓTESIS**:

Es posible estandarizar en nuestro país ensayos directos de diagnóstico molecular, con cebadores propios, bajos volúmenes de muestra y reactivos, competitivos, de bajo costo y soportados en una tecnología propia (SUMA), que permitan la detección y cuantificación del ARN del VHC en suero y plasma humano con factibilidad para ser introducidos en la Red Nacional de Salud de forma estable y sostenible.

Para aceptar o refutar esta hipótesis, se propuso el siguiente **OBJETIVO GENERAL**:

Estandarizar y evaluar ensayos moleculares para la detección y cuantificación del ARN del VHC en suero y plasma humano, soportados en la Tecnología SUMA, que sean competitivos y que cumplan las condiciones para ser introducidos en la Red Nacional de Salud de forma estable y sostenible.

Los **OBJETIVOS ESPECÍFICOS** son:

1. Estandarizar un ensayo molecular para la detección del ARN del VHC en suero y plasma.
2. Evaluar un ensayo molecular para la detección del ARN del VHC en suero y plasma.
3. Estandarizar un ensayo molecular para la cuantificación del ARN del VHC en suero y plasma.
4. Evaluar un ensayo molecular para la cuantificación del ARN del VHC en suero y plasma.
5. Realizar un análisis económico de la factibilidad de producción de los estuches desarrollados para la detección y la cuantificación del ARN del VHC.

IMPACTO CIENTÍFICO DE LA TESIS

La **novedad** de esta investigación, de gran relevancia y actualidad para la salud de nuestro pueblo, se basa en el desarrollo y aplicación de dos ultramicroensayos: uno para la confirmación de la infección por VHC (UMELOSA® HCV CUALITATIVO) y el otro para la determinación de la carga viral (UMELOSA® VHC CUANTITATIVO), ambos soportados en la Tecnología SUMA. Estos ensayos muestran características analíticas similares a los empleados a nivel mundial, pero utilizan menores volúmenes de muestra y reactivos que otros ensayos comerciales. Ambos ensayos utilizan, en las etapas de amplificación e hibridación,

cebadores y sondas de diseño propio, no descritos anteriormente en la bibliografía consultada, que permiten detectar con buena sensibilidad los seis genotipos del virus que circulan a nivel internacional. También se estandariza un protocolo para la extracción del ARN viral del suero o plasma y se reformula el tampón de lisis con la introducción de un ARN heterólogo, que contribuye a estabilizar el ARN viral conservado a 4 °C por largos períodos de tiempo. Estos aportes fueron motivo de dos patentes aprobadas. Por otra parte, se estandariza el protocolo de amplificación del ARN mediante las reacciones de Reverso transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, del inglés *Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction*) y se diseña un método de detección basado en la Tecnología SUMA, que emplea cebadores y sondas propias con calidad y bajo costo. Por otra parte, en la prueba cuantitativa se utiliza, por primera vez, un fragmento de la secuencia de la proteína p64K de *Neisseria meningitidis* (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Cuba), que se inserta en el plásmido para la obtención por transcripción *in vitro* de un ARN sintético del estándar interno (EI), el cual compete con el transcripto de ARN del estándar del VHC. Como resultado del presente trabajo, ya nuestro país cuenta con un ensayo molecular que confirma la presencia del VHC en personas seropositivas al ensayo de anticuerpos, así como con otro ensayo que permite determinar la carga viral del VHC. Ambas pruebas son las primeras de sus tipos desarrolladas y registradas en Cuba y factibles de ser implementadas en el Programa Nacional de Salud de forma estable y sostenible.

Los resultados de este trabajo presentan los siguientes **aportes de carácter científico**: proporcionan un marco metodológico para futuras investigaciones en cuanto al diseño, estandarización, escalado productivo y evaluación de nuevos ensayos de diagnóstico molecular en Cuba; proveen estrategias para la normalización y validación de los ensayos de acuerdo con las actualizaciones de las Buenas Prácticas de Fabricación de Diagnosticadores establecidas por el Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED). Los ensayos moleculares desarrollados en este trabajo permiten conocer nuevos datos epidemiológicos reales del VHC en la población cubana que habita en diferentes condiciones; permiten determinar las personas realmente infectadas por el VHC y aplicar más eficientemente la terapia antiviral debido a los fuertes efectos adversos del tratamiento y su alto costo; permiten monitorizar la respuesta de los pacientes bajo tratamiento con diferentes esquemas de terapia antiviral y establecer un protocolo de mejor

efectividad para diferentes estadios de la enfermedad (aguda o crónica), o el tiempo de tratamiento de acuerdo al genotipo viral que presente cada paciente.

Además, el ensayo cualitativo permite, además, evaluar la eficacia de un candidato vacunal cubano (CIGB-230) tanto en su uso terapéutico en pacientes con hepatitis C crónica, como en su uso preventivo en pacientes pre-dialíticos que presentan alto riesgo de adquirir la enfermedad; confirmar la presencia del virus en donantes de órganos, vivos o fallecidos, para el Programa Nacional de Trasplante, pues aporta más seguridad al procedimiento y contribuye al éxito del mismo. Por otra parte, el ensayo cuantitativo posibilita realizar estudios de resistencia antiviral y evaluación de nuevos fármacos, lo que eleva a nivel internacional el análisis de los protocolos de ensayos clínicos.

IMPACTO ECONÓMICO Y SOCIAL

La introducción del ensayo confirmatorio UMELOSA® HCV CUALITATIVO en el Sistema Nacional de Salud es de gran importancia para la detección de los individuos verdaderos positivos. Esto se explica porque un ensayo serológico positivo indica que la persona presenta títulos elevados de anticuerpos contra el virus, pero puede ser que en ese momento no tenga replicación viral porque sufrió una remisión espontánea del mismo o porque se encuentre bajo tratamiento antiviral y el ARN viral no sea detectable; por ello, no se debe considerar que un seropositivo al VHC está infectado sin antes confirmarlo mediante este ensayo molecular cualitativo. Además, esta prueba permite detectar aquellos casos falsos negativos que pueden estar en el período de seroconversión inmunológica donde no hay anticuerpos pero sí partículas virales; igualmente posibilita el estudio de grupos de riesgo como: trasplantados, inmunodeprimidos, hemofílicos, hemodializados y drogadictos por vía intravenosa, que son propensos a la inmunodepresión y pueden resultar falsos negativos por el ensayo de anticuerpos. La disponibilidad de este método molecular evita que las personas negativas a dicho ensayo pero seropositivas al Anti-VHC se sometan a una biopsia hepática, procedimiento invasivo con riesgo de complicaciones graves en el 0,004 % de los casos y con un costo de 250 USD si se realiza por laparoscopia, el cual requiere, además, que el paciente sea hospitalizado al menos un día, por lo que también incide en la estabilidad laboral. Este ensayo confirmatorio es muy conveniente porque, solo en los bancos de sangre, alrededor del 48 % de los donantes que resultan positivos al UMELISA HCV no presentan replicación viral activa y son negativos a la prueba confirmatoria, de ahí que sea innecesario aplicar costosos tratamientos

antivirales a este grupo significativo de personas. En Cuba, un tratamiento estándar por 48 semanas, con Interferón alfa 2b recombinante más RBV, tiene un costo aproximado de 8 000 USD y si es de importación, ronda los 25 000 USD. Se realizan cerca de 600 000 donaciones de sangre anuales donde el 0,9 % son positivas a anti-VHC (5 400 donaciones); de estas, el 48 % son negativas al ARN viral (2 592 personas). Si todas estas personas recibieran el tratamiento de producción nacional, esto le costaría al país la cuantiosa suma de 21 millones de USD en perjuicio de los pacientes realmente infectados. El ensayo molecular confirmaría al 52 % de los pacientes seropositivos en banco de sangre con replicación viral activa, en ellos se concentrarían, más racionalmente, el tratamiento adecuado y los demás recursos. La extensión, desde el 2005, del ensayo cualitativo a dos laboratorios de La Habana, ha permitido evaluar todos los pacientes de los servicios de hemodiálisis, de trasplante y de gastroenterología pediátrica del país.

Igualmente, la introducción del ensayo de cuantificación de la carga viral del VHC, UMELOSA® VHC CUANTITATIVO, permitirá el seguimiento de los pacientes tratados definiendo la conducta terapéutica a seguir, pues si bien es cierto que la carga viral no define la mejor terapia, resulta imprescindible para evaluar su eficacia y es un indicador pronóstico de la respuesta del individuo una vez retirado el tratamiento, pues la disminución de al menos dos logaritmos de la carga viral a las 12 semanas de tratamiento, indica una alta probabilidad de que el paciente tenga una elevada RVS al concluir el mismo y logre eliminar el virus. De no ser así, se debe valorar la continuidad o suspensión del tratamiento antiviral.

Los resultados de este trabajo han sido avalados por su publicación en revistas internacionales arbitradas como *Analytical Biochemistry*, *Journal of Virological Methods*, *Biologicals*, *Biotecnología Aplicada* y *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*; dos patentes otorgadas por la OCPI, dos registros otorgados por el CECMED, 24 presentaciones en eventos nacionales e internacionales y la obtención de distinciones tales como: Premio Anual de Salud Pública (2002), Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba (2002), Premio Nacional de Innovación Tecnológica (2002), Premios Relevantes Fóruns de Ciencia y Técnica (1994, 1995, 2000, 2002, 2004, 2009 y 2010) y dos Premios Relevantes Especiales XVI Fórum de Ciencia y Técnica a Nivel Provincial (2009).

CAPÍTULO 1: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. El virus de la hepatitis C: estructura y características

El VHC fue identificado por primera vez en 1989 mediante secuenciación molecular por Choo y colaboradores, es un virus de ARN, tiene forma esférica y un diámetro que oscila entre 55 y 65 nm, presenta una envoltura lipoproteica y pertenece a la familia *Flaviviridae*, género *Hepacivirus* (Wakita *et al.* 2005; Muñoz, 2006).

En la figura 1.1 se representa el ciclo de vida y el genoma del VHC (Schaefer y Chung, 2012). Su genoma está constituido por un ARN de simple cadena, de polaridad positiva, de 9,6 kb que codifica para una poliproteína de aproximadamente 3 000 aa (Figura 1.1.B).

El genoma viral está flanqueado por RNC en los extremos terminales 3' y 5'. La RNC 5', de aproximadamente 341 nucleótidos (nt), es altamente conservada dentro del genoma viral, por lo que se usa en el diseño de oligonucleótidos cebadores para la PCR, método que amplifica secuencias de interés para el diagnóstico molecular (Barba, 2008). La RNC 5' es vital para el inicio de la traducción de las proteínas virales, ya que en ella se ubica el sitio de reconocimiento ribosomal, IRES (*Internal ribosomal entry site*, siglas del inglés), que promueve la traducción de la región codificante para dar lugar a la poliproteína viral, que es procesada proteolíticamente para generar las proteínas maduras: proteína de la nucleocápsida (C, del inglés, *Core*), glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2) y proteínas no estructurales: p7, NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a, NS5b (Barba, 2008; Schaefer y Chung, 2012).

La proteína *Core* presenta un alto contenido de aa básicos (arginina y lisina), particularmente en su extremo amino (23,5%), rasgo propio de proteínas que interactúan con los ácidos nucleicos. Presenta un perfil hidrofóbico similar al de las proteínas de las cápsidas de los *Flavivirus*, por lo que se comprobó que podía unirse al ARN viral para formar la cápsida del VHC (Lemon *et al.*, 2007).

E1 y E2 son liberadas de la poliproteína viral mediante la acción de una peptidasa señal hospedera. La región que codifica para E2 es la más variable del genoma viral probablemente por la mutación aleatoria y la selección de los mutantes capaces de escapar de los anticuerpos neutralizantes producidos por el hospedero (Blackard y Sherman, 2007). La proteína p7 forma un canal iónico dependiente de calcio que puede ser inactivado por antivirales como la Amantadina (Griffin *et al.*, 2003).

La proteína de transmembrana NS2 tiene un dominio proteasa del tipo cisteína que forma, junto al extremo amino de NS3, una metaloproteasa dependiente de zinc que hidroliza la unión NS2/NS3 (Brass *et al.*, 2006). NS3 es responsable de las rupturas proteolíticas en los siguientes puntos: NS3/NS4a, NS4a/NS4b, NS4b/NS5a, NS5a/NS5b, para dar como resultado las proteínas: NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b (Lemon *et al.*, 2007). NS3 exhibe además actividad helicasa (Dumont *et al.*, 2006). Esta proteína es fundamental para la replicación del virus y constituye un blanco atractivo en la terapia antiviral (Brass *et al.*, 2006).

La región NS4 de la poliproteína contiene los péptidos NS4a y NS4b. NS4a actúa como cofactor de la proteasa NS3, además de participar en el anclaje del complejo de replicación (Einav *et al.*, 2004). NS4B es hidrofóbico, participa en el ensamblaje del complejo replicativo del virus y su actividad GTPasa es importante en la replicación del ARN (Guann-Yi, 2006).

En la región NS5 está presente la actividad polimerasa ARN dependiente, esencial en la replicación del ARN viral. La función de la polimerasa es convertir la cadena simple positiva en una cadena negativa intermediaria que sirva como molde para la producción repetitiva de cadenas positivas y la obtención de los nuevos viriones (Munakata *et al.*, 2005).

La RNC 3' puede considerarse como una estructura tripartita que abarca el sitio final 3', una cola de poli U (uracilo) y una región altamente conservada denominada cola X del extremo 3'. La región de poli U puede variar incluso dentro del mismo paciente infectado, pero la secuencia X es altamente conservada incluso entre los genotipos 1a y 1b que son los más divergentes genéticamente (Yanagi *et al.*, 1999).

El VHC se replica principalmente en los hepatocitos (Sugano *et al.*, 1995), aunque se han detectado genoma y antígenos virales en otras células del hígado, como las células de Kupffer y las endoteliales (Blight *et al.*, 1994). Se ha demostrado que el virus puede replicarse en células mononucleadas de sangre periférica (linfocitos T y linfocitos B), en células polimorfonucleadas (monocitos), en células de los nódulos linfáticos y en células epiteliales del tracto gastrointestinal y del cerebro (Deforges *et al.*, 2004; Forton *et al.*, 2004).

1.2. Variabilidad del VHC

El VHC tiene alta variabilidad (Choo *et al.*, 1991) lo que incide significativamente en la ausencia de anticuerpos neutralizantes efectivos, el alto porcentaje de personas infectadas que avanzan a la cronicidad y la baja efectividad frente a los tratamientos y a los preparados vacunales (Chevaliez y Pawlotsky, 2006). Un individuo

con ARN del VHC detectable está realmente infectado con una población compleja de variantes virales llamadas cuasiespecies (Simmonds, 2004; Blackard y Sherman, 2007). La variabilidad genética generada constantemente a causa de la acumulación de mutaciones en el genoma viral, producida por el alto rango de error de NS5B (1 por cada 10^3 o 10^4 nt copiados) y la carencia de actividad correctora, combinada con una alta tasa de producción viral, superior a 10^{12} viriones por día, conllevan a la existencia de esta población heterogénea de cuasiespecies virales en los individuos infectados (Simmonds, 2004). Estas poblaciones son un gran conjunto de variantes genéticas que pueden adaptarse a presiones selectivas como el reconocimiento inmunológico, los tratamientos antivirales y las vacunas (Bukh *et al.*, 1995; Blackard y Sherman, 2007).

Los genes codificantes para las glicoproteínas de la envoltura son los más variables, mientras los codificantes para *Core* y algunas proteínas no estructurales, como NS3, tienen menos variabilidad (Choo *et al.*, 1991). Los primeros 27 aa del ectodominio de E2 forman la región hipervariable 1 que difiere hasta en un 80 % entre los genotipos virales (Penin *et al.*, 2004). Se ha descrito la región hipervariable 2 dentro de la proteína E2 de las cepas del genotipo 1, constituida por siete aa (posiciones 91-97) que muestran un 100 % de diversidad de secuencia (Kato, 2001). Estas regiones se encuentran bajo una constante presión de selección de mutaciones, probablemente porque son sitios de reconocimiento de anticuerpos neutralizantes y pudieran contribuir a la evasión del sistema inmune por parte del VHC y a la persistencia viral (Boulestin *et al.*, 2002).

Dada la variabilidad viral se estableció una primera clasificación para los genotipos del VHC que se nombraron con los números del 1-11 (Bukh *et al.*, 1995; Tokita *et al.*, 1996), pero estudios filogenéticos posteriores basados en los análisis de secuencias han revelado que existen seis genotipos virales, los cuales difieren en sus secuencias de nt entre un 31-33 %, y a su vez dentro de ellos, diferentes subtipos denominados: 1a, 1b, 2a, 2b, etc., que difieren en su secuencia de nt en un 20-25 % (Simmonds, 2004; Simmonds *et al.*, 2005). En los últimos años se ha hecho referencia a un nuevo genotipo 7a, que difiere en gran medida de los anteriores (Bowden y Berzsenyi, 2006; GenBank, 2009). Los genotipos se distribuyen en diferentes regiones geográficas del planeta (Figura 1.2), por ejemplo, en la zona de América y el Caribe predomina el genotipo 1, en Europa los genotipos 2 y 3, en Asia fundamentalmente 4, 5, 6, aunque debido a las grandes migraciones económicas ya se han mezclado muchos de ellos (Organización Mundial de la Salud, 2003b; Shepard *et al.*, 2005; Hajarizadeh *et al.*, 2013).

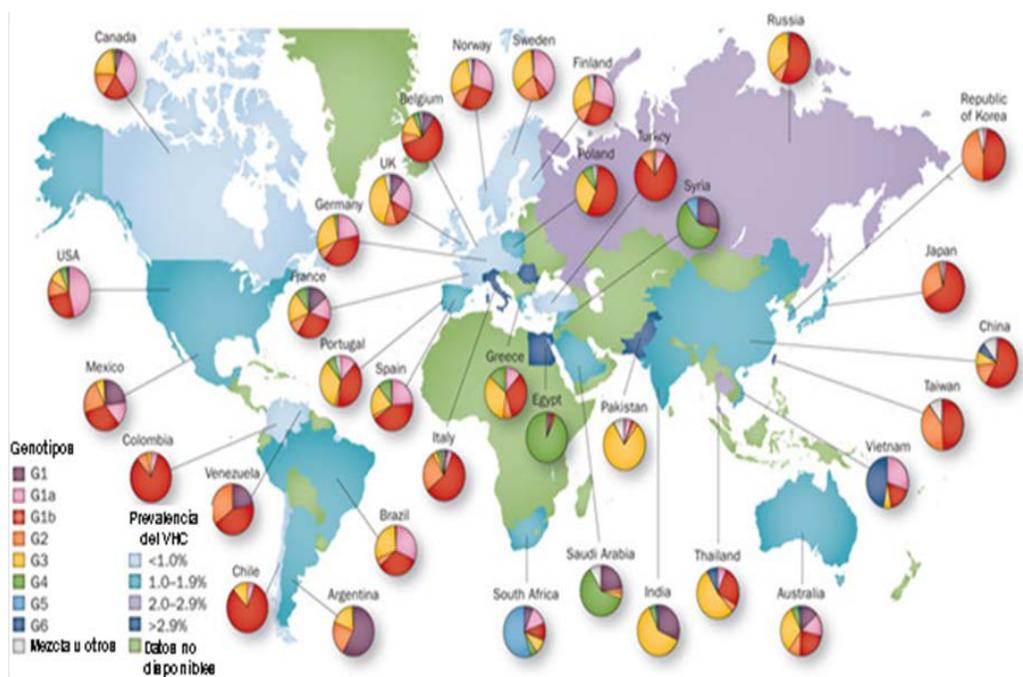


Figura 1.2. Prevalencia mundial estimada de la infección por el VHC y distribución de sus seis genotipos alrededor del mundo (Hajarizadeh *et al.*, 2013)

Además, los genotipos se diferencian en aspectos como la carga viral y la respuesta clínica al tratamiento, lo que dificulta el diagnóstico y la terapéutica (Zeuzem, 2001).

Se han descrito varios eventos de recombinación para el VHC, aunque hasta ahora son poco frecuentes. Este hecho pudiera alcanzar serias consecuencias clínicas y epidemiológicas porque dificulta el correcto genotipado de los pacientes por los métodos comerciales disponibles y facilita el intercambio de mutaciones resistentes entre las distintas poblaciones (Gonzalez-Candelas *et al.*, 2011).

Los primeros estudios realizados en nuestro país para determinar los genotipos circulantes dentro de la población infectada por el VHC coincidieron en la predominancia del 1b (Padrón *et al.*, 1995a; Roca *et al.*, 1999). En 2007 Vilar y colaboradores estudiaron la eficacia de dos tratamientos en 100 pacientes, a los cuales se les determinó su genotipo y se encontró la siguiente distribución: con genotipo 1 el 89 %; con 2/3 el 4 %; y el 7 % con combinaciones de genotipos no definidas.

Otro estudio realizado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y el Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA) durante el 2011 con más de mil pacientes cubanos, mostró la siguiente distribución: genotipo 1 (93 %), genotipo 2 (2,59 %), genotipo 3 (1,73 %) y genotipo 6 (1,73 %). Dentro de este grupo estudiado no se reportaron pacientes con los genotipos 4 o 5 (González-Horta *et al.*, 2011).

González González, YJ

En un estudio de genotipaje realizado en el IPK en 2009 a un grupo de pacientes mono infectados con el VHC y coinfectados con VHC/VIH, se obtuvo que el 11,9 % presentaban genotipo 1a, el 82,1 % el 1b y el resto, las combinaciones 1a/3a, 1b/3a, a 1b/4a y 1a/1b/3a (Rodríguez-Lay *et al.*, 2012).

1.3. Epidemiología

En Europa y Estados Unidos la hepatitis C es la hepatopatía crónica más común; además es la causa más frecuente de trasplante hepático a nivel mundial (Zaltron *et al.*, 2012). Datos estimados indican que aproximadamente 185 millones de personas (2,8 % de la población mundial) presentan anticuerpos anti-VHC y cada año se infectan entre 3-4 millones de personas y ocurren alrededor de 350 000 muertes por causas relacionadas con esta patología (Mohd *et al.*, 2012). Los mayores índices de seroprevalencia se encuentran en África y Asia (Mohd, *et al.*, 2012); mientras que los países más industrializados en América del Norte, el noroeste de Europa y Australia muestran los menores índices (Shepard *et al.*, 2005). Se ha estimado que el 80-90 % de las personas con anticuerpos anti-VHC son también positivas al ARN viral (Mauss *et al.*, 2012).

En nuestro país se estima que en 2012, el 0,8 % de los donantes de bancos de sangre poseía anticuerpos anti-VHC (TecnoSUMA, 2013), cifra con tendencia al aumento desde 1992, cuando se comenzó la pesquisa de anticuerpos contra el VHC en bancos de sangre, con el ensayo UMELISA HCV desarrollado por el CIE,

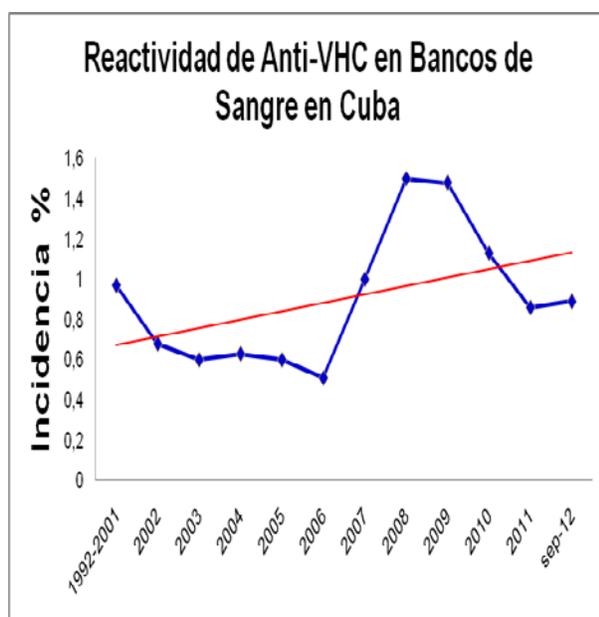


figura 1.3 (Padrón, 1998). Estudios realizados en grupos de riesgo, específicamente en los servicios de hemodiálisis de la región occidental, mostraron valores de seroprevalencia de 16,9 % a 76 % (Capote *et al.*, 2005; Santana *et al.*, 2009). Santana y colaboradores en 2009 encontraron una correlación del 55 % entre anti-VHC y ARN viral.

Figura 1.3. Gráfico que muestra la reactividad de anticuerpos contra el VHC en bancos de sangre cubanos (Curva de Incidencia (%) vs Años de pesquisa). Esta pesquisa comenzó por Ciudad de la Habana en 1992 y se extendió paulatinamente a todo el país. A través de estos 20 años se ha observado una tendencia al aumento (TecnoSUMA, 2013)

En otro estudio realizado por Ballester y colaboradores en 2005, se aprecian los altos niveles de anti-VHC en otros grupos de riesgo como son: hemofílicos (59 %), donantes por plasmaféresis (47 %), trasplantados (79,2 %), pacientes multitransfundidos (51,6 %), pacientes con enfermedades onco-hematológicas (19,5 %), llegando hasta 95,6 % de anti-VHC positivos en unidades de hemodiálisis. Además, de los seropositivos al

VIH, el 14,2 % de los adultos y el 10 % de los niños son anti-VHC positivos (Bello *et al.*, 2005; Bello *et al.*, 2010). Lo anterior nos muestra que a pesar de todos los esfuerzos realizados por el MINSAP para disminuir la transmisión de este virus, esta enfermedad es en la actualidad, un serio problema de salud en Cuba.

La exposición al virus por vía parenteral es la forma más eficiente de transmisión y el uso de drogas, intravenosas y intranasales, es el principal modo de transmisión a nivel mundial (Shepard *et al.*, 2005). En el pasado, las transfusiones de sangre, el uso de derivados plasmáticos y los trasplantes de órganos fueron una vía importante. En la actualidad esta vía se ha reducido marcadamente por la realización de rigurosos exámenes a los donantes y hemoderivados, así como al instrumental médico (Ghany *et al.*, 2009).

Otros factores de riesgo para la transmisión de la enfermedad son el sexo con una pareja infectada y la promiscuidad. Esta vía es mucho menos eficiente en comparación con otros virus, siendo muy bajos los índices de transmisión para relaciones monógamas duraderas. La transmisión perinatal solo ocurre en el 2,7-8,4 % de los infantes nacidos de madres infectadas con VHC (Shepard *et al.*, 2005). En un 30 % de los individuos no ha sido posible definir la causa de exposición al virus (Zaltron *et al.*, 2012).

1.4. Historia natural

El tiempo de incubación con el VHC es variable. A veces es posible detectar ARN viral en sangre o hígado a partir de la segunda semana posterior a la exposición (Ghany *et al.*, 2009). El pico típico de título viral durante la infección aguda es de 10^4 - 10^8 copias/mL (Chen *et al.*, 1995). A partir de las 6-12 semanas posteriores a la exposición los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) comienzan a elevarse, mientras que los de ARN viral comienzan a bajar (Rehermann y Nascimbeni, 2005). Los niveles de ALT varían entre los individuos infectados y como promedio alcanzan niveles 10-30 veces superiores a los normales (Mauss *et al.*, 2012).

Más del 60 % de los pacientes con infección aguda por el VHC son asintomáticos o muestran síntomas suaves. La ictericia, manifestación clínica de hepatitis aguda, aparece en menos del 25 % de los casos (Mauss *et al.*, 2012), por lo que la enfermedad en este período es raramente detectada (Bruno y Facciotto, 2008).

Del 80-90 % de los pacientes con el VHC desarrollan una infección crónica, definida como la presencia de ARN viral por más de seis meses posteriores al contagio. En la mayoría de estos pacientes los títulos virales son relativamente estables, de 2-3 Logs (logaritmos decimales) inferiores a los observados en la fase aguda (Rehermann y Nascimbeni, 2005). Casi siempre es asintomática la transición de hepatitis aguda a crónica. Un individuo puede estar infectado varios años antes de que aparezcan los primeros síntomas (Bruno y Facciotto, 2008), los cuales son inespecíficos, poco frecuentes y no reflejan la progresión de la enfermedad. Entre los más comunes están la fatiga, el dolor abdominal y la pérdida del apetito y de peso corporal (Delahooke, 2004). Los pacientes con hepatitis C crónica se caracterizan por tener niveles medianamente elevados de ALT y una

fibrosis hepática progresiva a pesar de la pobre correlación entre la histología hepática y las concentraciones de las aminotransferasas. Los pacientes con niveles normales de ALT generalmente presentan inflamación crónica (Mauss *et al.*, 2012).

La ocurrencia de fallo hepático fulminante por infección con el VHC es bastante rara (Farci *et al.*, 1996), siendo más común en pacientes co-infectados crónicamente con el virus de la hepatitis B (VHB) (Chu *et al.*, 1999).

La cirrosis hepática es el principal determinante de la morbilidad y la mortalidad asociadas con la hepatitis C crónica. El riesgo de desarrollar cirrosis en los pacientes con infección crónica es del 5-25 % en un período de 20-30 años (Ghany *et al.*, 2009). Una proporción significativa de los pacientes cirróticos presentan carcinoma hepatocelular con el transcurso del tiempo, para una tasa de progresión anual de 1-3 % (Ghany *et al.*, 2009).

Aparecen manifestaciones extrahepáticas en el 30-40 % de los pacientes infectados con el VHC (Zignego y Craxi, 2008). Estas incluyen alteraciones inmunológicas como la crioglobulinemia mixta, la producción de factor reumatoide y diferentes linfomas (Zaltron *et al.*, 2012). Se han observado posibles asociaciones con desórdenes metabólicos como la resistencia a la insulina, la diabetes mellitus tipo 2 y la esteatohepatitis (Del Campo y Romero-Gomez, 2009); así como con trastornos renales como las glomerulopatías (Latt *et al.*, 2012).

El sexo masculino, la edad de infección avanzada, el consumo de alcohol, la presencia de esteatosis hepática y la coinfección con el VIH y el VHB se asocian con la progresión de la enfermedad (Delahooke, 2004).

El fondo genético del individuo es otro elemento crítico. Se ha demostrado una fuerte asociación entre la resolución viral y la presencia de un polimorfismo de nucleótido simple (SNP, del inglés, *Single-Nucleotide Polymorphism*) en la región promotora/potenciadora del gen de la IL-28B codificante para el IFN- λ 3. Se ha descrito que los índices de clarificación y de éxito en la terapia aumentan el doble en los pacientes con genotipo C/C (Thimme *et al.*, 2012). Por otra parte, en pacientes afroamericanos el índice de progresión hacia la cirrosis es menor aunque, paradójicamente, este grupo étnico presenta una mayor tasa de infección, de carcinoma hepatocelular y un menor índice de respuesta a las terapias que su similar caucásico (Seeff, 2002).

1.5. Tratamientos

El objetivo de los tratamientos contra el VHC consiste en erradicar la infección y prevenir las complicaciones tardías y la muerte asociadas con la enfermedad. En la actualidad, para el tratamiento de la infección crónica se recomienda, según las Guías de Consenso Europea y Americana, la combinación de inyecciones subcutáneas semanales de IFN α -peg y la administración diaria, por vía oral, del antiviral RBV (Hadziyannis *et al.*, 2004; Dienstag y McHutchison, 2006; Ghany *et al.*, 2009; FDA- CDER, 2010).

Estos medicamentos son administrados por 48 semanas a los pacientes con los genotipos 1, 4, 5 y 6, y por 24 semanas a los infectados con 2 y 3 (Ghany *et al.*, 2009). Esta combinación induce una RVS, definida como la

ausencia de ARN viral en sangre por 24 semanas posteriores a la finalización de la terapia, en un 40-50 % de los pacientes infectados con el genotipo 1 o 4 y en un 80 % o más en aquellos que presentan genotipo 2 o 3 (Ghany *et al.*, 2009, Ghany *et al.*, 2011). Se ha sugerido que puede detectarse ocasionalmente material genético del VHC en sujetos teóricamente curados de la infección (Radkoski *et al.*, 2005), pero en general se plantea que la infección está erradicada cuando se alcanza la RVS (Lopez-Suñé, 2010; Ghany *et al.*, 2011).

Sin embargo, el tratamiento con IFN α -peg y RBV presenta serios efectos secundarios. Entre los más comunes se encuentran fatiga, dolor de cabeza, fiebre y rigidez, aunque también puede causar efectos psiquiátricos (depresión, irritabilidad, insomnio), neutropenia, anemia, sarpullidos, tos, hiperuricemia, entre otros (Ghany *et al.*, 2009). Estos efectos constituyen la causa fundamental de abandono de la terapia. Además, en muchas ocasiones conllevan al empleo de otros medicamentos que provocan la aparición de nuevos efectos secundarios asociados lo que encarece aún más el tratamiento (Ghany *et al.*, 2009).

En 2011 fueron aprobados por las Agencia Europea y Americana de Medicamentos (EMA, del inglés *European Medicines Agency* y FDA, del inglés, *Food and Drug Administration*, respectivamente) los antivirales Telaprevir y Boceprevir que inhiben la proteasa NS3/NS4A (EMA, 2012a; EMA, 2012b). Ambos inhibidores integran una triple terapia en combinación con IFN α -peg y RBV (Ghany *et al.*, 2011). Estas nuevas combinaciones indujeron una RVS en el 66-75 % de los pacientes no tratados anteriormente (Lopez-Suñé, 2010; Ghany *et al.*, 2011). A pesar de que esta terapia indujo una RVS significativamente superior a la del tratamiento clásico con IFN α -peg y RBV, provoca la adición de nuevos efectos secundarios severos como eritema cutáneo e incremento de la anemia, es más cara, está restringida al genotipo 1 del virus y no protege frente a la reinfección (Buti y Homs, 2012; Mauss *et al.*, 2012; Pawlotsky, 2012).

Para reducir la duración de los tratamientos de los individuos infectados con el genotipo 1 y disminuir los efectos secundarios debidos al uso del IFN α -peg, a principios de 2013 se publicó el estudio preliminar de un ensayo clínico libre de interferón (IFN). En el mismo se utilizaron diferentes combinaciones de dosis de dos potentes inhibidores de la proteasa NS3, un nucleósido inhibidor de la polimerasa NS5B y la RBV. Se obtuvo una alta efectividad a las 12 semanas de tratamiento para los pacientes vírgenes (93 y 95 %) y menor efectividad para aquellos no respondedores a tratamientos anteriores (Poordad *et al.*, 2013).

Desde 2009 se han publicado varios estudios de asociación del genoma humano con la respuesta al tratamiento con IFN (Ge *et al.*, 2009; Rallon *et al.*, 2009; Thimme *et al.*, 2012), pues se ha encontrado que un SNP del gen de la IL-28B (rs12979860, sustitución de C/C por C/T o T/T) está asociado a una respuesta pobre al tratamiento con IFN α -peg y RBV. Los pacientes infectados por el VHC y que tienen un genotipo salvaje de la IL-28B (C/C), presentan una tasa dos veces mayor de RVS al tratamiento con IFN, tanto si son VIH negativos (Rauch *et al.*, 2010) como VIH positivos (Thomas *et al.*, 2009). Esto se ha asociado al aclaramiento espontáneo de la infección por el VHC en pacientes VIH negativos. En un estudio suizo, este efecto solo se observó en pacientes con genotipo 1 o 4 (Lopez-Suñé *et al.* 2010). Debido a la trascendencia de estos hallazgos, la determinación del polimorfismo de la IL-28B a cada paciente se ha incorporado, cada vez más, a la práctica clínica como factor predictivo en la respuesta al tratamiento; esto ha impulsado el uso de terapias personalizadas de acuerdo a las características individuales del paciente y del virus, lo cual traza una nueva ruta para lograr la efectividad (Lok *et al.*, 2012).

1.6. Diagnóstico del virus de la hepatitis C

El diagnóstico virológico y el seguimiento de los pacientes infectados con el VHC está basado en dos tipos de ensayos: los indirectos, ensayos serológicos que detectan anticuerpos específicos contra el VHC y los ensayos directos, que detectan, cuantifican y caracterizan los componentes de las partículas virales, como son el ARN viral y el antígeno de la nucleocápsida (Scott y Gretch, 2007). Las pruebas serológicas son suficientes cuando se sospecha que la persona cursa una hepatitis crónica por virus C. No obstante, un resultado serológico positivo al anti-VHC puede significar que el paciente presenta una hepatitis crónica por VHC o tuvo una remisión espontánea (Lefrere *et al.*, 1997) y la única forma de diferenciarlas es mediante la detección del ARN viral por técnicas moleculares. Es muy útil detectar este último, e incluso obligatorio en algunos países, cuando se sospecha de una infección aguda porque los anticuerpos anti-VHC pueden demorar hasta tres meses en aparecer después de contraer la infección. Ambas pruebas son de gran importancia en el diagnóstico de la infección, la decisión terapéutica y la estimación de la respuesta al tratamiento de un paciente con VHC (Terrault *et al.*, 2005; Chevaliez y Pawlotsky, 2006; Mauss *et al.*, 2012).

1.6.1. Ensayos indirectos

1.6.1.1. Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)

La pesquisa inicial de la infección por el VHC se realiza a través de las pruebas serológicas para la detección de los anticuerpos anti-VHC, tipo IgG, mediante ensayos inmunoenzimáticos (EIA, del inglés *Enzyme Immunoassay*), en específico los ELISA (Ensayo de inmunoabsorbente unido a enzima, del inglés, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Esto consiste en detectar la respuesta inmunológica humoral del paciente infectado contra proteínas virales, tanto de regiones estructurales (*Core*) como no estructurales (NS3, NS4, NS5). Debido a lo difícil y costoso que es cultivar las proteínas nativas del VHC, los métodos de EIA utilizan antígenos artificiales obtenidos por ingeniería genética (antígenos recombinantes) o por síntesis química (péptidos sintéticos), o bien, mezclas de ambos, para capturar los anticuerpos anti-VHC en microplacas o micropartículas (Carithers *et al.*, 2000). Los primeros EIA para anti-VHC detectaban anticuerpos contra una sola proteína antigénica recombinante (*Core*-100-3). En los EIA de 2^{da} generación (EIA-2) se incluyeron proteínas del *Core* (c22-3) y el producto de la región NS3/NS4 (c33c). Los ensayos de 3^{ra} generación (EIA-3) son más sensibles porque incorporan además la proteína NS5, además de que optimizan las características de los antígenos utilizados en los EIA-2 (Pawlotsky *et al.*, 1995). En el informe de resultados de estos ensayos se debe indicar la relación de positividad y los valores de corte del mismo, ya que pueden variar en función de cada marca comercial (Muñoz, 2006).

Este tipo de prueba solo es útil un tiempo después del contagio, lo que se conoce como período de ventana serológico (variable de un paciente a otro, puede ser de uno a seis meses) (Huarte y Casi, 2004). Cuando se trata de individuos inmunocompetentes los ensayos de 2^{da} y 3^{ra} generación tienen una sensibilidad mayor del 98 % y permiten detectar una seroconversión entre las cuatro y diez semanas post-infección (Muñoz, 2006). En los grupos de riesgo, como el de individuos inmunodeprimidos (hemodializados, receptores de trasplante sólido o de médula ósea y personas seropositivas al VIH), la sensibilidad de los EIA oscila entre 50 y 95 % según el grado de inmunodeficiencia (Huarte y Casi, 2004). Por ello, en estos casos es necesario realizar el diagnóstico molecular del ARN del VHC para confirmar la presencia o no del virus (Pawlotsky, 2003b).

1.6.1.2. Ensayos de confirmación de anticuerpos (RIBA- LIA)

La asociación de un factor de riesgo percutáneo para la infección por el VHC (inyecciones, transfusiones, cirugías, trasplantes o hemodiálisis), con niveles elevados de alanina aminotransferasa (ALT) en un individuo

anti-VHC positivo por EIA-2/3, es indicativa de infección activa por el VHC en más del 98 % de los casos, lo que reduce la necesidad de los ensayos de confirmación. Pero, para el caso de individuos donantes de sangre, de bajo riesgo (población supuestamente sana) y transaminasas normales, se han desarrollado pruebas para confirmar la especificidad de los ELISA (Hoofnagle, 2002; Strader *et al.*, 2004). Estas son los inmunoblots, inmunoensayos suplementarios al ELISA que permiten discriminar antígenos virales específicos, blancos de la respuesta inmunológica detectada en el ELISA. Para ello, los antígenos virales se fijan a un soporte (nitrocelulosa-nylon) sobre el cual se capturan los anticuerpos del paciente. Dichos antígenos son de origen recombinante en el RIBA (*Recombinant Immuno Blotting Assay*) o sintético en el LIA (*Linear Immuno Blotting Assay*). Los antígenos presentes incluyen regiones estructurales y no estructurales. El inmunoblot se considera positivo cuando reacciona contra al menos dos antígenos distintos, indeterminado cuando hay reactividad frente a uno solo y negativo cuando no reacciona con ninguno (Huarte y Casi, 2004). Su aplicación en la práctica clínica es limitada. Es útil para confirmar resultados de ELISA de baja relación de positividad o resultados discordantes de ELISA positivo con PCR cualitativa no detectable. Un resultado por RIBA-LIA negativo en pacientes con ELISA positivo indicaría un resultado falso positivo de este último. Un resultado RIBA-LIA positivo con al menos dos determinaciones no detectables de ARN VHC por PCR cualitativa, sugiere fuertemente que la infección por VHC fue resuelta (Pawlotsky, 2003b).

1.6.1.3. Detección de anticuerpos IgM anti-Core VHC

Se han desarrollado EIA capaces de detectar y cuantificar anticuerpos IgM anti-Core VHC en el suero de pacientes con infección aguda (anti-VHC positivos). Se puede detectar IgM anti-Core en el 50-90 % de los pacientes con hepatitis C aguda pero también, a más bajo título, en el 50-70 % de los pacientes con hepatitis C crónica (Logvinoff *et al.*, 2004).

Pese a la alta sensibilidad, los EIA presentan limitaciones relacionadas con el agente y la condición del huésped (Muñoz, 2006) pues: - no permiten discriminar entre los sujetos con infección aguda, crónica o pasada con recuperación; - los anticuerpos perduran de por vida en los pacientes crónicos y por más de 18-20 años en aquellos que se recuperan ya sea en forma espontánea (20-30 % de los casos) o después de un tratamiento; - no permiten la detección precoz de una infección aguda en el caso de las seroconversiones tardías; - aparecen falsos positivos en población sana y de bajo riesgo, como donantes de sangre y pacientes

con autoinmunidad, así como falsos negativos en pacientes inmunocomprometidos (pacientes con VIH y hemodializados).

Un estudio realizado con 15 250 embarazadas mostró que un resultado IgM anti-Core positivo y una alta carga viral en la madre ($>10^6$ UI/mL) en la fase aguda de la enfermedad, constituyeron factores de riesgo importantes para que ocurriera transmisión vertical del VHC (Dal Molin *et al.*, 2002).

1.6.2. Ensayos directos

La replicación del VHC en los hepatocitos libera las partículas víricas producidas al medio extracelular. Una parte de ellas pasan al torrente circulatorio y se vuelven dianas potenciales para el diagnóstico de laboratorio basado en la detección directa de los viriones, bien por detección de su genoma o de sus proteínas (Huarte y Casi, 2004). Durante el período de ventana de la infección aguda y en el caso de los pacientes inmunodeficientes, el diagnóstico por detección de anti-VHC puede fallar, lo que demanda el uso de pruebas de detección del virus (Muñoz, 2006). Asimismo, la detección y cuantificación del ARN viral es esencial para monitorizar la respuesta al tratamiento en la infección crónica.

1.6.2.1. Ensayos para la detección del antígeno de la nucleocápsida del VHC

La proteína Core ha sido un blanco atractivo para el desarrollo de ensayos de diagnóstico por ser una proteína estructural de secuencia altamente conservada entre los distintos genotipos, lo que superaría el problema de la variabilidad del VHC (Mondelli, 2004). Los niveles de este antígeno correlacionan con los valores de viremia cuantitativa por técnica de biología molecular y cada picogramo equivale a 8 000 UI/ml. Esta técnica no detecta niveles por debajo de 20 000 UI/ml, lo que restringe su uso clínico (Bouvier *et al.*, 2002; Pawlotsky, 2002a). Durante el período previo a la seroconversión, el antígeno Core se detecta como promedio uno o tres días después que el ARN del VHC (Courouce *et al.*, 2000; Veillon *et al.*, 2003; Mauss *et al.*, 2012). Este hecho permite identificar la infección aguda antes de que ocurra la seroconversión por anticuerpos, lo cual estrecha significativamente el período de ventana serológica (Mondelli, 2004).

Después de los primeros días, la cinética del antígeno Core transcurre en paralelo a la cinética del ARN del VHC (Bouvier *et al.*, 2002), de ahí que se haya propuesto a este antígeno como un marcador de la replicación del VHC. Dada la correlación lineal, significativa e independiente del genotipo entre las concentraciones séricas del ARN del VHC y del antígeno Core, este marcador se presenta como una alternativa eficiente para

aquellos laboratorios clínicos donde no siempre hay personal o equipamiento adecuados para el trabajo con técnicas de biología molecular (Mondelli, 2004). Pero puede ser poco útil confiar solamente en el ensayo del antígeno *Core* cuando se trata de infecciones tempranas, puesto que en ese estadio no existe buena concordancia entre esta prueba y los ensayos por PCR (Reddy *et al.*, 2006). La determinación de la proteína *Core* podría complementar a los métodos moleculares para estimar la carga viral y para monitorizar el tratamiento antiviral y la recurrencia del VHC en receptores de trasplante.

-1.6.2.2. Técnicas para la detección y cuantificación de ácidos nucleicos

El ARN del VHC circula en la sangre a niveles muy bajos, indetectables por técnicas clásicas de hibridación, por lo cual se precisan para su detección ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (NAT, *Nucleic Acid Amplification Technique*, siglas del inglés). Generalmente los ensayos cualitativos son más sensibles que sus similares cuantitativos (Huarte y Casi, 2004) y permiten confirmar la presencia del VHC en pacientes seropositivos a anti-VHC y dan seguimiento a la terapia antiviral (Pawlotsky, 2002a; Mauss *et al.*, 2012).

Las pruebas NAT se basan en el principio de amplificación de la señal (ADN ramificado, bDNA, *branched DNA*, siglas del inglés) o en el principio de amplificación del blanco o diana, ya sea a través de una PCR, o de una Amplificación Mediada por Transcripción (TMA, *Transcription Mediated Amplification*, siglas del inglés) (Pawlotsky, 2002a; Mauss *et al.*, 2012).

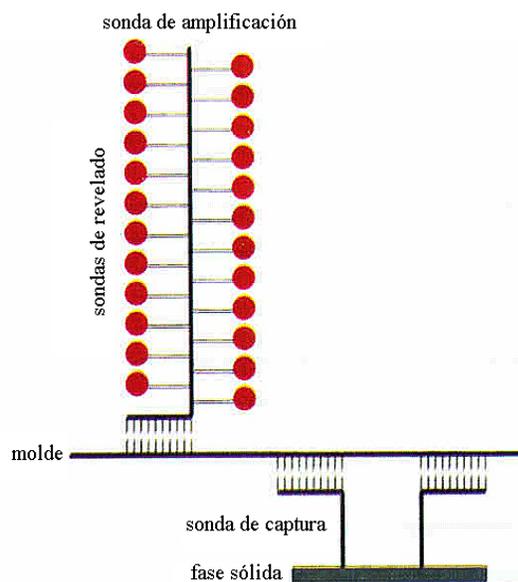
Existen diferentes clasificaciones de los ensayos NAT (Huarte y Casi, 2004) en dependencia de:

A) Si se detecta o cuantifica el ácido nucleico son cualitativos o cuantitativos, respectivamente: Los cualitativos detectan la presencia del ácido nucleico, son muy sensibles y más baratos que los cuantitativos. Para detectar ADN se puede utilizar una PCR y para ARN es necesario realizar una RT-PCR. Para cuantificar ADN se puede hacer una PCR competitiva (qPCR, del inglés *quantitative PCR*) y para cuantificar ARN se realiza una qRT-PCR competitiva. Los ensayos de PCR en tiempo real son muy sensibles y se usan para cuantificar. Estos métodos cuantitativos pueden ser relativos o absolutos en dependencia de si utilizan un estándar externo o interno, respectivamente, para la cuantificación (Davis, 2002).

B) Si se amplifica la señal de detección o el ácido nucleico blanco:

1.6.2.2.1 Técnica de amplificación de la señal

Se basa en el principio del ADN ramificado o bDNA (figura 1.4), actualmente representado por el ensayo *Versant HCV RNA assay v3.0* (Siemens Medical Solutions Diagnostics, EE.UU.). Consiste en la desnaturalización del ácido nucleico blanco (ARN del VHC) y la hibridación al mismo de dos sondas: una se une a la fase sólida y la otra se une a la molécula de ADN ramificada, mediante hibridaciones sucesivas, se



unen miles de oligonucleótidos de ADN conjugado a enzimas, las cuales producen una señal quimioluminiscente (Sarrazin, 2002).

Figura 1.4. Principio de ensayo ADN ramificado. Su característica principal es el uso de una molécula compleja de ADN, que permite unirse a miles de sondas marcadas con la enzima fosfatasa alcalina, la cual hidroliza un sustrato quimioluminiscente. La lectura se realiza en un luminómetro (Sarrazin, 2002).

El ensayo cuantifica mediante calibradores externos de ADN.

Es rápido, sencillo y reproducible, solo utiliza 50 µL de suero, no requiere de equipos especiales para la amplificación y tiene un rango lineal de cuantificación muy amplio en su versión 3.0 (615 - 8 x 10⁶ UI/mL) independientemente del genotipo viral (Morishima, 2004). Se utiliza en ensayos cuantitativos por tener menor sensibilidad que los métodos que amplifican ácidos nucleicos, requiere de un Luminómetro para la lectura (Gretch, 1997; Gorrin *et al.*, 2003).

1.6.2.2.2. Técnicas de amplificación del blanco

1.6.2.2.2.1. Técnica de Amplificación mediada por la transcripción (TMA)

La TMA fue desarrollada por *GenProbe*, EE.UU (Figura 1.6). Este método se utiliza para la detección cualitativa del ARN de VHC por su elevada sensibilidad (Comanor *et al.*, 2001; Hendricks, 2003). Se realiza en un solo tubo de reacción, en tres pasos: captura del blanco, amplificación del blanco y detección de los amplicones mediante hibridación protegida. La amplificación se basa en una reacción isotérmica y emplea las enzimas transcriptasa inversa y ARN polimerasa T7; los amplicones resultantes son ARN de simple cadena, que hibridan con una sonda marcada con enzima, que a su vez, hidroliza un sustrato luminiscente (Comanor *et al.*, 2001; Sarrazin, 2002).

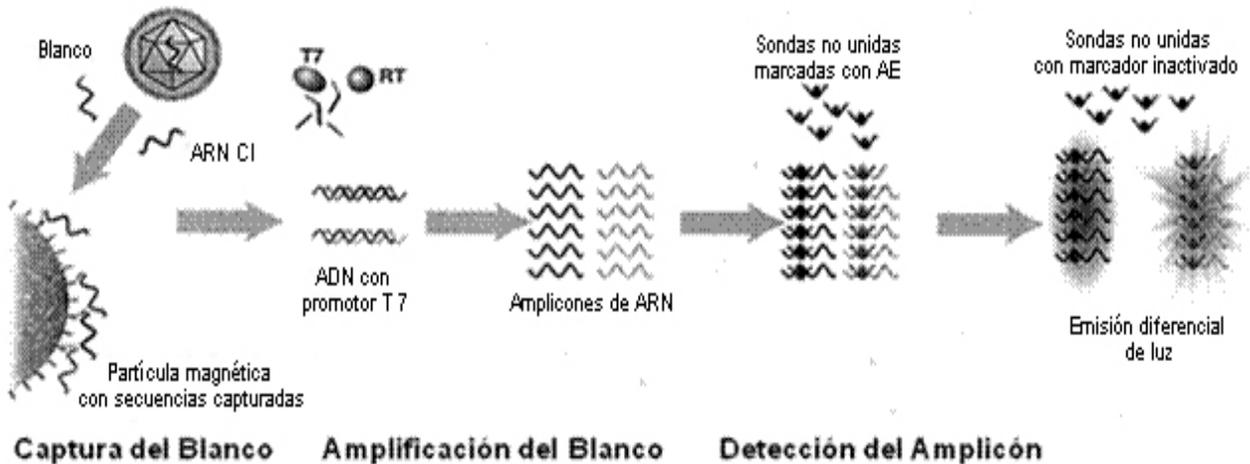
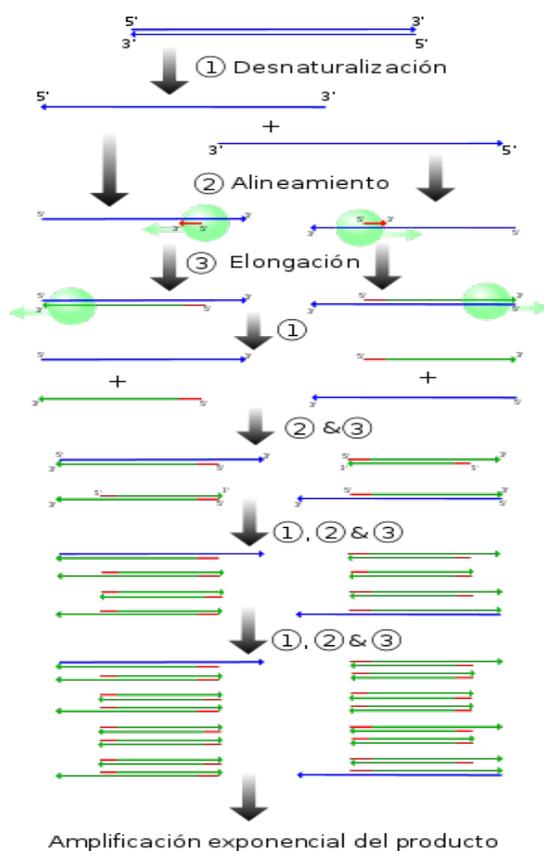


Figura 1.6. Principio de ensayo del TMA. Partículas magnéticas capturan el ácido nucleico, luego ocurre una RT donde se obtiene un ADNc con la secuencia del promotor de la ARN polimerasa T7, la cual produce amplicones de ARN. Estos se detectan mediante el sistema Avidina/ Estreptavidina y ésta última está unida a una enzima que hidroliza un sustrato luminiscente (Comanor et al., 2001).

La TMA se emplea en el ensayo *Versant™ HCV RNA Qualitative Assay v3.0* (Siemens Medical Solutions Diagnostics, EE.UU.). Este ensayo es más sensible que la RT-PCR del *Cobas Amplicor HCV test*, con un límite de detección de 5-10 UI/mL, sensibilidad del 96-100 % y especificidad mayor de 99,5 %, independientemente del genotipo del VHC (Sarrazin, 2001; Hofmann, 2005).

1.6.2.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Es la técnica más empleada en el diagnóstico molecular (Sambrook y Russel, 2001; Mauss et al., 2012), fue descrita en 1983 por Kary Mullis y consiste en la replicación *in vitro* del ADN. Permite obtener millones de copias de un fragmento de ADN específico, a partir de un mínimo de ellas (Bartlett y Stirling, 2003). En el proceso se suceden múltiples pasos de desnaturalización del ADN, hibridación a los cebadores y polimerización de la secuencia del ADNc por una ADN polimerasa (Figura 1.7). Para ello se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar entre sí, tras cada fase de replicación, las hebras de ADN recién formadas y, a continuación, dejar que las polimerasas se les unan para duplicarlas nuevamente. Esta técnica se ha favorecido con el surgimiento de secuenciadores térmicos o termocicladores que son equipos automatizados (Sambrook y Russel, 2001).



Los componentes más importantes son: ADN molde, enzima ADN polimerasa (la más usada es la *Taq* ADN polimerasa proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus*), cebadores (directo e inverso, secuencias cortas de 6-40 nt, complementarios a cada hebra del ADN y que flanquean la zona a amplificar), cofactores enzimáticos (iones divalentes que favorecen la actividad enzimática: Mg^{2+} y Mn^{2+}), mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos de adenina, timina, guanina y citosina (dNTPs) y tampón mantener el pH óptimo para la actividad enzimática (Rose *et al.*, 2003).

Figura 1.7. Esquema general de la PCR: La reacción ocurre en un secuenciador térmico donde primero se calienta a 95 °C el ADN blanco para separar las cadenas. Luego se enfría hasta la temperatura de hibridación de los cebadores a las cadenas libres de ADN. Una enzima polimerasa ADN dependiente extiende la nueva cadena de ADNc y así se continúa con ciclos repetidos de desnaturalización, hibridación y elongación hasta obtener millones de amplicones.

1.6.2.2.2.1. Técnicas basadas en la PCR

Existen numerosas técnicas basadas en la PCR que son ensayos de rutina en los laboratorios de diagnóstico molecular, entre ellas se encuentran:

a) Transcripción inversa y PCR (RT-PCR): Proceso de amplificación de ARN (ribosomal, mensajero, genómico o viral) que comienza con RT de ARN a ADNc mediante una enzima transcriptasa inversa (ej. enzima del AMV, virus de la Mieloblastosis Aviar) y continúa con amplificación por PCR (Mulder, 1994). Actualmente la RT-PCR se realiza en un solo paso, lo cual es ventajoso ya que reduce el riesgo de contaminaciones entre las muestras (Sambrook y Russel, 2001). Es un método ampliamente utilizado en el diagnóstico de virus de ARN como Dengue, VIH 1 y VHC (Sangasang *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2005; Cabezas-Fernández y Cabeza-Barrera, 2012). Entre los ensayos de RT-PCR está el *Amplicor™ HCV test v1.0*, con un límite de detección de 100 UI/mL al 95 %, su versión 2.0, de 50 UI/mL de sensibilidad para todos los genotipos, emplea la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus* que también tiene actividad reverso transcriptasa, además permite hacer la RT-PCR y la detección en un solo paso y en el mismo tubo de

reacción, con lo que se disminuyó el tiempo de ensayo y aumentó la sensibilidad del método (Nolte, 2001; Cabezas-Fernández y Cabeza-Barrera, 2012).

b) PCR Anidada: Esta técnica consta de dos reacciones de PCR secuenciales y utiliza como molde o blanco para la segunda reacción, el producto amplificado obtenido de la primera ronda de PCR. El mayor número de ciclos produce una cantidad superior de amplicones por lo que incrementa la sensibilidad, mientras que la utilización de cuatro cebadores diferentes (dos cebadores para la primera amplificación y dos internos a la secuencia resultante para la segunda ronda) asegura la especificidad del ensayo porque disminuye la probabilidad de que se amplifique una secuencia no deseada (Rose *et al.*, 2003).

c) PCR múltiple: Es útil para detectar varios analitos en un mismo ensayo; pueden emplearse a la vez dos o más juegos de cebadores específicos para diferentes secuencias de ADN. Los cebadores se diseñan y evalúan cuidadosamente porque deben tener similares temperaturas de hibridación (T_m , temperatura a la que hibrida el cebador a la cadena de ADN o ARN durante la PCR o RT-PCR), no deben formar lazos, ni horquillas internas, ni ser complementarios entre sí. Un ejemplo es el ensayo *Multiplex HIV-1 RNA/HCV RNA NAT*, utilizado en bancos de sangre para detectar simultáneamente VIH-1 y VHC en la misma bolsa, o en mezclas de bolsas negativas al anti-VHC y al anti-VIH-1, lo cual hace más económica la pesquisa de ambos virus en personas que están en "ventana inmunológica" (Tang *et al.*, 1997).

d) PCR en tiempo real: Es capaz de amplificar y detectar el blanco de ácido nucleico simultáneamente, al final de cada ciclo de amplificación, lo que permite el monitoreo directo de la PCR. Inicialmente se produce RT del molde de ARN para generar hebras complementarias de ADNc que luego se amplifican con una ADN polimerasa. Simultáneamente se logra la detección mediante el uso de oligonucleótidos específicos a la secuencia del blanco unidos a dos moléculas distintas: un fluoróforo donador y una molécula aceptora. Estas sondas se unen al ADNc en una región entre los dos cebadores de la PCR y son degradadas o liberadas por la ADN polimerasa durante la síntesis del ADN. Si hay degradación, el aceptor y el fluoróforo son liberados y separados, por lo que el último comienza a emitir fluorescencia. Esta señal se intensifica tras cada ronda de amplificación y es proporcional a la cantidad inicial de ARN. La cuantificación es absoluta ya que se compara la cinética de la amplificación del blanco con la del control interno de concentración inicial conocida. Los ensayos comerciales disponibles emplean variaciones de este principio de fluoróforo-aceptor. Entre ellas está

la sonda *TaqMan* utilizada en los ensayos *COBAS TaqMan 2.0 HCV* y *COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan 2,0 HCV*, métodos muy sensibles y con rangos de cuantificación muy amplios, de 10 UI/mL-10 millones UI/mL (Ghany *et al.*, 2009; Mauss *et al.*, 2012). Reduce el tiempo de ensayo de 16 h a 5 horas (Tuailon *et al.*, 2010). La PCR presenta alta sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y versatilidad (cada segmento de ácido nucleico es un blanco potencial para el diagnóstico), detecta ADN proviral latente, se aplica a gran variedad de muestras clínicas y forenses, produce resultados rápidos en comparación con los cultivos, las muestras se inactivan al comenzar el proceso y se precisa de menos cantidad de muestra en comparación con otras técnicas (Mauss *et al.*, 2012). En cambio, puede producir resultados falsos positivos por similitud entre genes celulares y secuencias retrovirales (inespecificidad) o por contaminaciones cruzadas entre muestras y arrastre de amplicones ambientales. En la PCR también se obtienen falsos negativos por la conservación inadecuada de las muestras (evitar descongelaciones sucesivas), por tener una carga viral menor al límite de detección del ensayo y por la presencia de inhibidores de la amplificación (Liegler y Grant, 2006).

1.6.2.2.2.2. Inhibidores de la PCR

Los inhibidores de la PCR contenidos en las muestras ejercen sus efectos mediante interacción directa con los ácidos nucleicos (RNAsas o DNAsas) o por interferencia con la ADN polimerasa. La unión directa de los inhibidores a la simple o doble cadena del ácido nucleico puede evitar la amplificación y facilitar la copurificación del inhibidor con el mismo. Los inhibidores también pueden bloquear la actividad enzimática de la ADN polimerasa, por ejemplo, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) interacciona con los iones Mg^{2+} , cofactores de la actividad catalítica, disminuye su disponibilidad e inhibe así la PCR. (Pasloske y Wu, 1998; Muller *et al.*, 2004; Liegler y Grant, 2006). En la tabla 1.1 se muestran algunos inhibidores de la PCR.

Tabla 1.1. Inhibidores de la PCR

Inhibidores	Concentración de inhibición
Dodecilsulfato sódico	> 0,005 %
Fenol	> 0,2 %
Etanol	> 1 %
Isopropanol	> 1 %
Acetato de Sodio	> 5 mmol/L
Cloruro de Sodio	> 25 mmol/L
EDTA	> 0,5 mmol/L
Hemoglobina	> 1 g/mL
Heparina	> 0,15 UI/mL
Urea	> 20 mmol/L

Dentro de las muestras con inhibidores de la PCR se incluyen: telas, tejidos, suelos y sangre. Ejemplos de inhibidores en sangre: grupo hemo, hemoglobina, lactoferrina e inmunoglobulina G (Radstrom *et al.*, 2004). También son inhibidores de la PCR algunas sustancias de las heces fecales, las proteinasas de la leche y la urea de la orina. Los materiales y reactivos que se ponen en contacto con las muestras durante su procesamiento (sales, detergentes iónicos y alcoholes) son otra fuente de inhibidores. La PCR se inhibe por medicamentos como la heparina, por lo que antes de la toma de muestra se debe encuestar al paciente para evitar la presencia en la sangre de este inhibidor, fuente de falsos negativos entre los hemodializados (Holodniy *et al.*, 1991; Kleiboeker, 2003; Yao *et al.*, 2005).

Existen varios métodos para disminuir los efectos de los inhibidores que no se eliminan durante la extracción: adicionar en la reacción mayores concentraciones de ADN polimerasa para saturar los inhibidores que la enlazan (Katcher y Schwartz, 1994); emplear la albúmina de suero bovino por su unión a ciertos inhibidores y capturar el ADN con agarosa de baja temperatura de fusión lo cual libera los inhibidores. Diluir la muestra antes de la extracción o añadir menos ADN molde a la amplificación puede mejorar el rendimiento en gran medida, pues los inhibidores también se diluyen y su actividad puede ser anulada o disminuida.

En la actualidad muchos ensayos de PCR empleados para detectar o cuantificar ARN o ADN poseen un control interno que detecta los inhibidores de la amplificación (Kontanis y Reed, 2006). La estrategia del control interno se ha combinado con la amplificación de dos blancos de diferentes tamaños para ensayar simultáneamente tanto a los inhibidores como a la degradación del ADN. La información obtenida sobre la inhibición y la degradación permite a los laboratorios tomar mejores decisiones en el procesamiento de las muestras y conduce a incrementar el éxito de la amplificación y la eficiencia del trabajo (Swango *et al.*, 2006).

1.6.2.3. Generalidades sobre técnicas cualitativas para la detección del ARN del VHC

La detección cualitativa del ARN del VHC consiste en determinar la existencia del ARN viral en diferentes tipos de muestras: suero, plasma, sangre total, sangre colectada en papel de filtro, saliva, cultivo de células y tejidos, semen entre otros (Mauss *et al.*, 2012). En estos ensayos, se utilizan secuencias de las regiones más conservadas del genoma viral como la RNC 5', aunque en los últimos años se han desarrollado ensayos dirigidos a la RNC 3' (Drexler *et al.*, 2009).

Los ensayos cualitativos reportan sus resultados en Positivos o No detectables. Independientemente del método debe informarse la sensibilidad del ensayo (límite de detección al 95 %) contra el Estándar Internacional del ARN del VHC (OMS) (Pawlotsky, 2003b; Chevaliez y Pawlotsky, 2006; Mauss *et al.*, 2012).

Los ensayos basados en la PCR pueden ser completamente manuales (detectan hasta 100 UI/mL de ARN del VHC), semiautomatizados (detectan hasta 50 UI/mL) o totalmente automatizados (PCR en tiempo real) que llegan a detectar hasta 15 UI/mL (Desombere *et al.*, 2005; Sarrazin *et al.*, 2006; Vermehren *et al.*, 2008).

Los ensayos comerciales cualitativos más utilizados en la actualidad se muestran en la tabla 1.2.

Tabla 1.2. Ensayos moleculares cualitativos para detectar el ARN del VHC

Firma Comercial	Ensayo Diagnóstico	Técnica	Límite detección (LD): (UI/mL)	Aplicación
Roche Molecular Systems, Pleasanton, EE.UU.	<i>Amplacor HCV Test v1.0</i>	RT-PCR (Manual)	100	Confirmar infección
	<i>Amplacor HCV Test v 2.0</i>	RT-PCR (Manual)	< 60	Confirmar infección
	<i>Cobas Amplacor HCV v 2.0</i>	RT-PCR (Semiautomático)	< 60	Confirmar infección
	<i>AmpliScreen v 2.0</i>	RT-PCR (Semiautomático)	< 50	Pesquisa de sangre
Siemens Healthcare Diagnostic, EE.UU.	<i>Versant HCV RNA v 3.0</i>	TMA (Semiautomático)	5-10	Confirmar infección /Pesquisa de sangre
Gen Probe, EE.UU.	<i>Procleix HIV/HCV assay</i>	TMA (Manual)	< 50	Confirmar infección /Pesquisa de sangre
	<i>Procleix Ultrio assay</i>	TMA (Semiautomático)	< 50	Confirmar infección /Pesquisa de sangre

En 2004 se estableció la aplicación de las técnicas NAT para la pesquisa de la sangre donada, lo cual ha estrechado el “período de ventana” de anticuerpos de 70-80 días a 10-30 días (Kraj y Nadder, 2007). Existen métodos diseñados para la pesquisa en bancos de sangre como *Ampli/Screen (Roche)* y *Procleix (Gene Probe)* que detectan el ARN del VHC en mezclas de plasmas de 24 bolsas de sangre con serología anti-VHC negativa (Strader *et al.*, 2004; Mauss *et al.*, 2012). Se ha reducido la transmisión por esta vía: el riesgo de transmisión por unidad ha caído de 1:100 000 a 1:500 000 o 1:1 000 000 (FDA, Guidance for Industry, 2011).

1.6.2.4. Generalidades sobre técnicas cuantitativas para determinar de la carga viral del VHC

La determinación de la carga viral (CV) del ARN del VHC (cantidad de virus presente en un volumen dado de sangre, usualmente 1 mL) permite caracterizar al individuo infectado y se considera un factor predictivo de respuesta al tratamiento (disminución de al menos 2 Log₁₀ con respecto al valor inicial) (Le Guillou-Guillemette y Lunel-Fabiani, 2009; Cabezas-Fernández y Cabeza-Barrera, 2012). Es una herramienta que posibilita

evaluar la cinética de replicación viral intra-tratamiento, sobre todo en las nuevas terapias que utilizan inhibidores de proteasas (Ghany *et al.*, 2011).

Como las técnicas cuantitativas han sido estandarizadas mediante transcritos de ARN de distinta naturaleza, longitud y secuencia, las diferentes unidades de medida no representan la misma cantidad de ARN en muestras clínicas. Además, hasta hace unos años los métodos comerciales de cuantificación del VHC tenían LD muy diferentes y no poseían un denominador común de medición, por tanto, no eran equivalentes ni comparables; por ejemplo, el ensayo *Cobas AmpliCor HCV Monitor v 2.0* ofrecía sus resultados en número de copias/mL y el *Versant HCV RNA 2.0 Assay*, en genomas equivalentes/mL. Para normalizar los resultados entre diferentes laboratorios, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció en 1999 el primer Estándar Internacional (IS) de referencia para la cuantificación del ARN del VHC en unidades internacionales (UI/mL) (Saldanha *et al.*, 1999); estas fueron adoptadas universalmente para facilitar la aplicación de las nuevas recomendaciones y pautas en la práctica clínica (Lee *et al.*, 2000; Pawlotsky *et al.*, 2000). Esto permitió una armonización entre los diferentes métodos y aunque en la actualidad es factible hacer comparaciones entre ellos desde el punto vista analítico, se aconseja utilizar la misma técnica para el seguimiento individual de cada paciente (Strader *et al.*, 2004).

La especificidad reportada para este tipo de ensayos era del 98-99 % independientemente del genotipo del VHC (Pawlotsky, 2003a) pero ya se sabe que la detectabilidad y la especificidad en los primeros ensayos no era la misma para todos los genotipos, generalmente 3 y 6 se detectaban cien veces menos que 1, 2, 4 y 5 y su cuantificación era muy inexacta, lo cual se pudo apreciar al evaluar el ensayo *Versant HCV RNA 2.0* contra su versión 3.0 (Desombere *et al.*, 2005).

Una CV inferior a 800 000 UI/mL se considera baja. Las muestras con CV por encima del extremo superior del rango lineal del ensayo deben ser diluidas 1/10 o 1/100 para la estimación de su concentración (Pawlotsky, 2003a). Por otra parte, variaciones en las estimaciones de CV inferiores a los 0,5 Log₁₀, suelen no tenerse en cuenta pues ocurren por variaciones intrínsecas a la técnica o al propio paciente. Cuando un paciente ya tratado tiene una CV por debajo del LD del ensayo no significa necesariamente que haya eliminado la infección, sino que su CV puede ser tan baja que no sea detectable; en ese caso se realizará un ensayo cualitativo por su mayor sensibilidad (Ghany *et al.*, 2011). En las pruebas cuantitativas se habla de resultados

Cuantificables (los que caen dentro del rango de la curva de cuantificación), Detectables pero No Cuantificables (los resultados que están por encima del LD pero por debajo del límite de cuantificación) y No Detectables (los inferiores al LD). Esta clasificación ha adquirido gran importancia en la práctica clínica actual para la toma de decisiones terapéuticas (Albeldawi *et al.*, 2010; Buti y Homs, 2012).

Los ensayos de CV se basan en técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (RT-PCR Competitiva, PCR en tiempo real) y de amplificación de la señal (bDNA). En la tabla 1.3 aparecen los más empleados actualmente.

Tabla 1.3. Ensayos moleculares cuantitativos para determinar la carga viral del ARN del VHC

Firma Comercial	Ensayo Diagnóstico	Técnica	LD (Rango dinámico de cuantificación) (UI/mL)	Conversión vs 1 UI/mL
	<i>Amplicor HCV Monitor v 2.0</i>	RT-PCR competitiva (Manual)	600 (600-5x10 ⁵)	0,9 copias/mL
Roche Molecular System, Pleasanton, EE.UU	<i>Cobas Amplicor HCV Monitor v 2.0</i>	RT-PCR competitiva (Semiautomático)	600 (600-5x10 ⁵)	2,7 copias/mL
	<i>COBAS TaqMan 2,0 HCV</i>	Tiempo Real (Semiautomático)	15 (25-69x10 ⁶)	2,7 copias/mL
	<i>Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan 2,0 HCV</i>	Tiempo Real (Semiautomático)	7,1(43-69x10 ⁶)	2,7 copias/mL
Siemens Healthcare Diag. EE.UU	<i>Versant HCV RNA v 3.0</i>	ADN ramificado (Semiautomático)	520 (615-7x10 ⁵)	5,2 copias/mL
Abbott Laboratories, EE.UU	<i>LCx HCV RNA</i>	RT-PCR Competitiva (Semiautomático)	23 (25-2,3x10 ⁶)	3,8 copias/mL
	<i>Abbott Real time HCV</i>	Tiempo Real (Automatizado)	12 (12-1x10 ⁸)	
National Genetics Institute, EE.UU	<i>HCV SuperQuant</i>	RT-PCR Competitiva (Semiautomático)	100 (600-1,47x10 ⁶)	3,4 copias/mL

Leyenda: LD: límite de detección al 95 %

Los ensayos cuantitativos pueden ser relativos o absolutos en dependencia de si utilizan un estándar externo o interno para la cuantificación:

- **Ensayos cuantitativos relativos:** La cuantificación relativa utiliza un estándar externo de cuantificación que no mide exactamente lo que se quiere determinar (por ejemplo, se utiliza un gen que muestra un mecanismo de expresión similar al de estudio y se extrapolan sus resultados de acuerdo a la concentración que se obtenga del gen conocido). Este método es muy útil y sencillo para analizar la expresión entre genes

(Freeman *et al.*, 1999). En general provee suficiente información sobre el analito en estudio pero no sirve para el seguimiento de pacientes en tratamiento, donde es muy importante el valor absoluto del analito.

- **Ensayos cuantitativos absolutos:** En la cuantificación absoluta se utiliza un estándar interno que compite con el estándar de cuantificación. Aunque es complejo el diseño y obtención del estándar interno, el método permite medir el valor absoluto del analito a determinar, elimina los errores tubo a tubo en el ensayo, posibilita detectar la presencia de inhibidores de la PCR y los resultados son comparables en el tiempo (Freeman *et al.*, 1999). Esta técnica es ventajosa para el monitoreo de tratamiento (Burns *et al.*, 2005; Belák, 2007), un ejemplo de la misma es la RT-PCR competitiva con estándares internos sintéticos (Zimmermann y Mannhalter, 1996; Kleiboeker, 2003).

1.6.2.5. Determinación del genotipo del VHC

Dada la heterogeneidad del VHC es preciso definir el genotipo predominante en el paciente infectado. Su determinación es obligatoria en pacientes que serán sometidos a terapia antiviral (Bowden y Berzsenyi 2006) porque, de acuerdo al genotipo, se seleccionará el esquema de tratamiento, el tiempo de duración del mismo, la dosis de RBV, además de ser un factor predictivo de respuesta al tratamiento antiviral (Manns *et al.*, 2001; Fried *et al.*, 2002; Hadziyannis *et al.*, 2004). Para la caracterización del genotipo se analiza la RNC 5' del virus mediante secuenciación, RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) o LiPA (*Linear Immuno Probe Assay*) (Stuyver *et al.* 1996; Ross *et al.*, 2000; Ansaldi *et al.*, 2001; Nolte *et al.*, 2003). Dichos métodos descritos involucran una amplificación previa por PCR por lo que adolecen de efectividad para detectar poblaciones minoritarias. Las infecciones mixtas se detectan cuando las subpoblaciones superan el 20 % de la viremia total (1-4 % de los ensayos realizados). La determinación de genotipo solo se puede realizar en pacientes con ARN positivo por RT-PCR.

1.6.2.6. Determinación del ARN del VHC por RT-PCR

En los ensayos moleculares para la detección o cuantificación del VHC primero es necesario aislar el ARN viral que circula a niveles muy bajos en la sangre (Huarte y Casi, 2004). La sensibilidad y especificidad del ensayo dependen mucho de la calidad de la extracción del ARN.

La figura 1.8 muestra el esquema general de los ensayos para la detección o cuantificación del ARN viral extraído de suero, plasma, sangre total o sangre seca sobre papel de filtro, saliva, semen y otros.

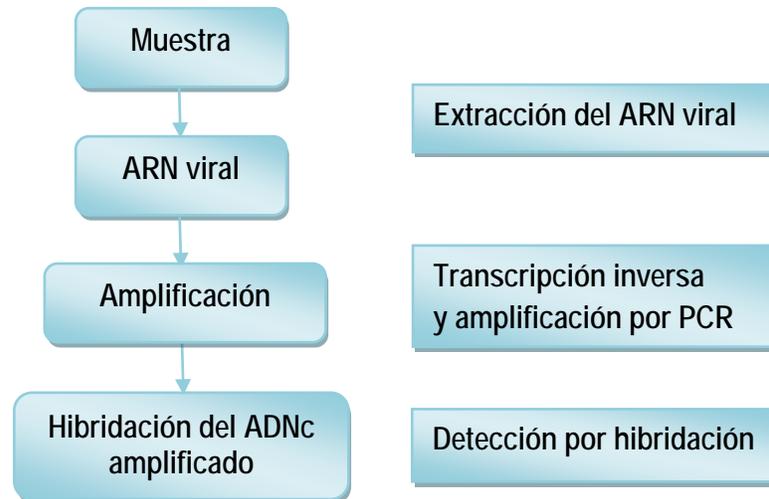


Figura 1.8. Etapas para detectar o cuantificar el ARN del VHC mediante RT-PCR. a) Extracción del ARN viral de la muestra; b) RT-PCR, en algunos casos se realiza también una PCR anidada para aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo; c) Detección por hibridación con revelado colorimétrico o fluorimétrico (Huarte y Casi, 2004).

La primera etapa consiste en aislar el ARN viral de la muestra, posteriormente se realiza una RT-PCR, que a veces incluye una PCR anidada (Huarte y Casi, 2004). Finalmente se hibridan los amplicones a las sondas de captura de la fase sólida y el revelado se realiza generalmente mediante hidrólisis enzimática que produce una señal luminosa, colorimétrica o fluorescente (Tijssen, 1993; Huarte y Casi, 2004).

1.6.2.6.1. Métodos de extracción del ARN viral

Existen métodos de extracción de los ARN virales basados en diferentes principios, su clave radica en evitar que las ribonucleasas (RNAsas) degraden el material, por lo que todos los protocolos se basan en la rápida inactivación de dichas enzimas. En 1979, Chirgwin y colaboradores inventaron un método para el aislamiento de ARN total (80-85 % de ribosomal, 10 % de transferencia y 1-5 % de mensajero) por homogenización en una solución de 4 mol/L de tiocianato de guanidina con 0,1 mol/L de 2-mercaptoetanol y cloroformo-alcohol isoamílico. En 1987, Chomczynski y Sacchi modificaron dicho tampón de lisis por una mezcla de tiocianato de guanidina y fenol-cloroformo, muy útil para procesar un gran número de muestras y para el aislamiento de pequeñas cantidades de ARN de células o tejidos. Las sales de guanidina como el tiocianato de guanidinio unido al fenol, son agentes caotrópicos fuertes que lisan las células y liberan los ácidos nucleicos, además de que desnaturalizan las proteínas como las RNAsas (Chomczynski y Sacchi, 1987). El volumen de tampón de

lisis a utilizar debe ser tres veces el volumen de muestra. La adición posterior de cloroformo genera una fase acuosa (contiene ARN), una fase orgánica (contiene proteínas desnaturalizadas) y una interfase de ADN.

Después de la separación de las fases por centrifugación, a la fase acuosa se le adiciona igual volumen de isopropanol para lograr una buena precipitación del ARN total, además se recomienda incubar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 18 horas para lograr un mayor rendimiento del precipitado. Los lavados con etanol y acetona garantizan la eliminación del isopropanol de la muestra y así se evita la inhibición de la *Taq* polimerasa por la acción de solventes orgánicos (Doyle, 1996). Las RNAsas se encuentran de forma natural en células y tejidos, en la grasa de los dedos y en las bacterias y hongos ambientales presentes en el polvo y el aire. Por tanto, el ARN extraído debe resuspenderse en agua libre de RNAsas que además contenga un inhibidor proteico de dichas nucleasas (Pasloske *et al.*, 1998; Pasloske y Wu, 1998).

1.6.2.6.2. Métodos de amplificación del ADN complementario

1.6.2.6.2.1. Reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

En los ensayos cualitativos para la determinación del ARN del VHC se utiliza una RT-PCR y si es necesario se incluye un segundo PCR o PCR anidada, para aumentar la sensibilidad y especificidad del ensayo (Mauss *et al.*, 2012). En los ensayos cuantitativos se emplea la RT-PCR competitiva donde se produce una competencia entre dos estándares (estándar de cuantificación del ARN blanco y un estándar interno) durante la RT y la amplificación. El estándar interno (EI) es un ARN heterólogo donde solo sus secuencias externas son complementarias a los cebadores del ensayo, los cuales son comunes también a la secuencia de ARN blanco contenida en las muestras y en el estándar de cuantificación, por tanto, durante la amplificación se produce una competencia con el EI. La relación obtenida de la señal del estándar de cuantificación y de la señal del EI permite construir una curva de cuantificación de relación de señal vs concentración del blanco, en ella se interpola la relación de la señal de la muestra/EI, lo que permite obtener la concentración de las muestras evaluadas. El estándar interno también se utiliza en los ensayos cualitativos como control interno, lo cual permite evaluar la eficiencia de recuperación del ARN durante su extracción, permite disminuir la variabilidad tubo a tubo durante la detección así como detectar inhibidores endógenos de la RT-PCR (Kleiboeker, 2003) y RNAsas en la muestra de partida (Muller *et al.*, 2004; Liegler y Grant, 2006).

1.6.2.6.3. Estándares y controles en los ensayos que cuantifican el ARN del VHC

Las técnicas de determinación de CV pueden poseer estándar de cuantificación con EI (absolutos) o con estándar externo (relativos). En el primer caso se garantiza una menor variabilidad tubo a tubo, ya que el EI y el estándar de cuantificación sufren las mismas variaciones y se compensan mutuamente (Davis, 2002). Un método de cuantificación exacto requiere que la variabilidad de cada paso sea estrictamente controlada, para ello, se le adiciona a la muestra un EI justamente antes del aislamiento del ARN viral (Mulder *et al.*, 1994). Un procedimiento más burdo consiste en adicionar el estándar al ARN de interés después que este ha sido purificado (Piatak *et al.*, 1993), pero ello no permite evaluar la calidad del proceso de extracción del ARN viral. Además los ensayos cuantitativos para VHC tendrán controles positivos para indicar que el ensayo se desarrolla según sus especificaciones (Pasloske *et al.*, 1998).

El estándar ideal debe ser homogéneo y estable en plasma, debe contener una secuencia de ARN conocida, no ha de implicar riesgos de infección para los analistas del laboratorio y debe ser aplicable en distintos ensayos para permitir la evaluación y comparación de los mismos (WalkerPeach *et al.*, 1999). El estándar cuantitativo y el control positivo pueden obtenerse a partir del virus atenuado o inactivo (Pasloske *et al.*, 1998), pero el VHC derivado de plasma es potencialmente infeccioso, genéticamente diverso y con tendencia a variar de lote a lote (WalkerPeach *et al.*, 1999). También pueden producirse por síntesis química (Zimmermann *et al.*, 2002) o por vía enzimática mediante la transcripción *in vitro* de un molde de ADN en ARN (Roth *et al.*, 1996; Pasloske *et al.*, 1998; Kleiboeker, 2003).

El estándar de ARN transcrito *in vitro* deberá contener la RNC 5' y la región codificante para el *Core*, por ser las más conservadas dentro del genoma viral (Tsukiyama *et al.*, 1993; Furione *et al.*, 1999; Baylis *et al.*, 2005). El transcripto deberá ser caracterizado y cuantificado mediante medición de la absorbancia a 260 nm. Por otra parte, además de compartir los sitios de unión a los cebadores, el EI deberá tener igual contenido de GC, pero menor longitud que el ARN de interés para una eficiencia de extracción y amplificación idénticas, pero deberá incluir un sitio distinto de unión a la sonda para su detección diferencial (Kleiboeker, 2003; Beld *et al.*, 2004). La compañía *Bayer* emplea rutinariamente un estándar de esa naturaleza como referencia para evaluar otros controles y para realizar la validación de los lotes de estuche. Dicho estándar se ha cuantificado con varios

ensayos comerciales y se ha obtenido una concordancia entre los mismos dentro de las $0,5 \log_{10}$ UI/mL, exactitud aceptada para los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (Baylis *et al.*, 2005).

Los controles y estándares de ARN sintético o viral son muy sensibles a la degradación por RNasas, por lo que los reactivos, puntas y tubos utilizados estarán absolutamente libres de dichas nucleasas. Además, después de su síntesis o aislamiento, el ARN debe ser conservado en un medio que minimice la hidrólisis química de los enlaces fosfatos por lo que se evitarán los valores altos de pH, las temperaturas elevadas y los cationes divalentes como Mg^{2+} y Mn^{2+} . No obstante existe el riesgo de que un lote de ARN libre de RNasas se contamine cada vez que se abra el frasco que lo contiene (Pasloske *et al.*, 1998).

1.6.2.6.3.1. Estándares obtenidos por transcripción *in vitro*

En 1984, Melton y colaboradores presentaron un método simple y eficiente para producir ARN de simple cadena: la transcripción *in vitro*, procedimiento basado en la síntesis específica de ARN de varios kb por la ARN polimerasa del bacteriófago SP6 de *Salmonella typhimurium*. La enzima inicia la transcripción en el promotor SP6, que puede estar clonado en un vector antes del sitio de clonaje múltiple. Esta técnica, igualmente válida con los promotores T3 o T7 de los bacteriófagos T3 y T7 de *Escherichia coli*, se ha generalizado por la disponibilidad de vectores de ADN plasmídico construidos con sitios de clonaje múltiple flanqueados por dos o tres promotores en tándem (Melton *et al.*, 1984).

Con este método se han producido estándares para uso en ensayos de diagnóstico; por ejemplo, el *Amplicor HCV Monitor[®] Test, v 2.0* (Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, EE.UU.) emplea un EI de 351 nt que se introduce dentro de cada muestra y se somete a todos los pasos del ensayo junto con el ARN del VHC (Instructivo de estuche *Amplicor HCV Monitor Test, v 2.0, 2004*).

1.6.2.6.4. Hibridación de ácidos nucleicos en fase sólida

La hibridación es la unión covalente de dos cadenas de ácidos nucleicos por complementariedad de las bases nitrogenadas, estas se unen entre sí por puentes de hidrógeno. Las condiciones varían según la naturaleza de la cadena nucleotídica a detectar (ARN o ADN), de la sonda (polinucleótidos vs oligonucleótidos; marcaje radioactivo, enzimático o fluorimétrico; sondas de ARN o ADN; sondas de doble cadena vs cadena simple) y de la fase sólida (Tijssen, 1993).

La hibridación de los ADN bicatenarios amplificados se realiza mediante sondas oligonucleotídicas específicas. Los amplicones se unen a los pocillos mediante hibridación con las sondas y su detección puede ser colorimétrica o fluorimétrica de acuerdo al producto de la reacción enzima-sustrato y al equipo disponible para realizar la lectura (Doyle, 1996). La hibridación en fase sólida se ha usado ampliamente en los ensayos comerciales para la detección y determinación de ARN del VHC (Chevaliez y Pawlotsky, 2006).

1.6.3. Tecnología SUMA

El hecho de que en Cuba se desarrollara la tecnología SUMA (Sistema Ultra Micro Analítico) en la década de los '80 del siglo pasado (Fernández-Yero, 2009), posibilita el estudio masivo de diversas patologías con una tecnología propia, caracterizada por el empleo de mínimos volúmenes de reactivos y muestras (5-35 μ L), un bajo costo de ejecución y determinado grado de automatización, características que la hacen particularmente adecuada para los programas de prevención en salud. Las técnicas de ultramicroELISA (UMELISA), basadas en el SUMA, constituyen el soporte de importantes programas de salud en el país (TecnoSUMA, 2013).

Dentro de los objetivos de trabajo del CIE está el desarrollo de pruebas económicas, confiables y escalables a niveles productivos para la pesquisa y confirmación del VHC en muestras humanas, las que, de acuerdo con las normas de las Buenas Prácticas de Fabricación de Diagnosticadores (CECMED-Regulación No. 47, 2007), soportan los programas nacionales de certificación de sangre y vigilancia epidemiológica de esta enfermedad.

1.7. Validación de los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos

La evaluación de las características analíticas de los ensayos NAT está descrita en las guías y normativas para la industria farmacéutica y biotecnológica como son las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) adoptadas por las agencias reguladoras: Administración de Drogas y Alimentos, FDA (*Food and Drug Administration*, siglas del inglés) y Agencia Europea de Medicamentos, EMEA (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, siglas del inglés) (Quintana y Apezteguía, 2010). En Cuba el CECMED establece la Regulación No. 47 del 2007: Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores.

1.7.1. Desempeño de los ensayos cualitativos (Regulación no. 47, CECMED, 2007)

Los parámetros a evaluar son: especificidad clínica, analítica (reactividad cruzada y estudio de genotipos), límite de detección o sensibilidad, robustez y evaluación contra un estuche comercial.

Especificidad clínica: La especificidad de un ensayo NAT es su capacidad de determinar inequívocamente la presencia de una secuencia específica de ADN o ARN dentro de una gran variedad de otras secuencias y depende en primera instancia de la selección de los cebadores y sondas para la detección del producto amplificado y, finalmente, de la rigidez de las condiciones de los procesos de amplificación y detección. También se define como la proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas por la prueba empleada.

Especificidad analítica: Es la demostración de que organismos no dianas (organismos estrechamente relacionados, otros patógenos y comensales) no tienen interacciones homólogas en el ensayo o no existe reactividad cruzada. Para ello se incluirá una concentración de estos organismos semejante a la densidad de los mismos en muestras clínicamente relevantes. Por otra parte, se deberán demostrar las variantes microbiológicas que es capaz de detectar el diagnosticador, como las diferentes variantes genotípicas y fenotípicas de un organismo en las diferentes matrices indicadas para el ensayo. Se recomienda evaluar dos concentraciones de estas variantes, una cercana al valor del LD y otra en un valor clínicamente relevante.

Límite de detección (LD) o sensibilidad analítica: El LD del ensayo es la menor cantidad de UI/mL de ARN que puede ser detectada el 95 % de las veces que hayan sido ensayadas. Es recomendable que se estime el LD mediante el uso de preparaciones cuantificadas por métodos de referencia, por ejemplo, diluciones de los Estándares Internacionales de la OMS en UI/mL y también se considerarán los diferentes materiales biológicos donde se pueda realizar la determinación.

Robustez: La robustez de un ensayo es la medida de su capacidad de no ver afectados sus resultados por pequeñas variaciones deliberadas en sus condiciones de ejecución por lo que ofrece una medida de su confiabilidad para el uso rutinario.

Evaluación del desempeño del diagnosticador en comparación con un estuche comercial: Para evaluar el desempeño de un diagnosticador se selecciona un estuche "Estándar de Oro" comercial y se evalúan muestras en paralelo en ambos ensayos, así como controles y paneles comerciales. Para evaluar su correcta correlación se debe calcular el índice de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R²), así como los parámetros de la recta de correlación (intercepto y pendiente).

1.7.2. Desempeño de los ensayos cuantitativos (Regulación No. 47, CECMED, 2007)

Al igual que para los ensayos cualitativos se deben evaluar los parámetros de especificidad clínica, especificidad analítica (reactividad cruzada y estudio de genotipos), robustez y evaluación contra un estuche comercial. A estos se le suman otros específicos como:

Linealidad: Este parámetro permite verificar el rango analítico del diagnosticador. Para su determinación se emplea un material de referencia internacional.

Límite de detección: Se ensayará el reactivo blanco o, en caso que sea apropiado, un número de muestras libres del analito en cuestión. Esto se realizará como mínimo entre 20-25 veces en una misma corrida para calcular la media y la desviación estándar (DE). Se estima el LD como la media más dos veces la DE calculada.

Precisión: Se ensayarán al menos tres muestras con concentraciones en el rango analítico y una de ellas con un valor cercano al límite de decisión médica. Para cada muestra se debe calcular la DE y el coeficiente de variación (CVar) dentro de la corrida y entre corridas, con al menos tres corridas. Generalmente se acepta un valor menor o igual al 10 % en la corrida y menor o igual al 20 % entre corridas.

Pruebas de concordancia: Los resultados se analizarán gráficamente y mediante la regresión lineal se determinarán la inclinación, el intercepto, el coeficiente de correlación y otras variables estadísticas que sean apropiadas tales como el error estándar estimado y los intervalos de confianza.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Controles y materiales de referencia

-**Control Negativo (CN):** Mezcla de sueros humanos procedentes de la Planta de Sueros y Hemoderivados (La Habana, Cuba), los cuales son negativos a los anticuerpos anti-VHC por el ensayo UMELISA HCV (CIE, Cuba) y el Sistema de *Sanofi Pasteur, Ortho y Deciscan* (Francia) y negativos a los ensayos UMELISA HBsAg y UMELISA HIV1+2 *recombinant*, ambos del CIE (La Habana, Cuba).

-**Control Positivo (CP):** Mezcla de plasmas procedentes de la Planta de Sueros y Hemoderivados (La Habana, Cuba), los cuales son positivos a anti-VHC por UMELISA HCV (CIE, Cuba) y el Sistema de *Sanofi Pasteur, Ortho y Deciscan* (Francia) y al ARN del VHC por el ensayo *AMPLICOR® Hepatitis C Virus Test v 2.0*. La CV de 5 000 UI/mL fue determinada con el *Amplicor HCV Monitor, v 2.0*.

-**Control de Corrida (RC) 96/586:** Control del ARN del VHC, genotipo 3, se preparó según el instructivo del NIBSC (*National Institute of Blood Standards and Controls*, siglas del inglés), 2002.

-**Control de Calidad (CC):** Mezcla de plasmas obtenidos en el Banco de Sangre de Marianao (BSM) (La Habana, Cuba), positivos a anti-VHC por el Sistema de *Sanofi Pasteur, Ortho y Deciscan* (Francia) y al ARN del VHC por UMELOSA® HCV CUALITATIVO (CIE, Cuba). La CV de 12 000 UI/mL (intervalo de confianza (IC): 3 715 a 38 000 UI/mL, equivalente a $\pm 0,5\text{Log}_{10}$) se determinó por *Amplicor HCV Monitor v 2.0* (Alemania).

-**Primera, Segunda y Tercera preparación del Estándar Internacional (IS) ARN del VHC de la OMS:** WHO 96/790, WHO 96/798 y WHO 06/100 (genotipo 1 del VHC) se reconstituyeron en agua libre de RNasas para una concentración de 100 000 UI/mL.

-**Estándares de referencia secundarios (ERS):** Los estándares CP52 y CP1107 se prepararon con mezclas de plasmas obtenidos en el BSM (Cuba), positivos a anti-VHC por el Sistema de *Sanofi Pasteur, Ortho y Deciscan* (Francia) y al ARN del VHC por UMELOSA® HCV CUALITATIVO (CIE, Cuba). Las CV se determinaron por *Amplicor HCV Monitor* (Alemania): $1,29 \times 10^5$ UI/mL y $2,67 \times 10^6$ UI/mL, respectivamente.

-**Estándar de Cuantificación del VHC:** Para la preparación de la curva del estándar de cuantificación del VHC se utilizó el transcrito *TVHC 0309-1* ($1,42 \times 10^{14}$ UI/mL de ARN del VHC), del cual se prepararon dos

series de diluciones en tampón de lisis (TL), hasta obtener concentraciones teóricas aproximadas de 1000, 10 000 y 200 000 UI/mL, las que se evaluaron frente al IS 06/100, diluido a 1000, 10 000 y 100 000 UI/mL. Se prepararon dos lotes de curva estándar de cuantificación de VHC (Tabla 2.1), se prepararon cuatro réplicas de cada punto de la curva, alícuotadas en 1 mL y se conservaron de 2 a 8 °C.

Tabla 2.1. Concentración de los puntos C1, C2 y C3 del Estándar de cuantificación del VHC evaluados frente al IS 06/100 del ensayo UMELOSA® VHC CUANTITATIVO

Estándar VHC de Cuantificación	Lote 1	Lote 2
C1	1,44 x 10 ³ UI/mL	1,14 x 10 ³ UI/mL
C2	1,12 x 10 ⁴ UI/mL	1,20 x 10 ⁴ UI/mL
C3	2,81 x 10 ⁵ UI/mL	2,25 x 10 ⁵ UI/mL

-Estándar Interno (EI): Para la preparación del estándar interno se utilizó el transcrito TEI-0309 de concentración 72 µg/µL, del cual se prepararon tres diluciones en TL (1:4x10⁶, 1:4x10⁷ y 1:4x10⁸), de 50 mL de cada una, para poder determinar la dilución óptima de competencia del ensayo. Las diluciones se conservaron de 2 a 8 °C.

-Panel de sensibilidad Pelicheck HCV-RNA (No.S2004, CLB: Laboratorio Central del Servicio de Transfusiones de Sangre de la Cruz Roja de Holanda): Contiene sueros con los genotipos 1 y 3.

-Panel de Genotipado 02/202 (HCV Genotype Panel del NIBSC): Contiene sueros con los seis genotipos del VHC a una concentración cada uno de 1 000 UI/mL.

Todos los controles y estándares se conservaron a 1 mL, en -70 °C, si no se especifica otra temperatura.

2.1.2. Muestras

Para la evaluación de los ensayos UMELOSA HCV CUALITATIVO y UMELOSA VHC CUANTITATIVO se obtuvieron muestras de suero y plasma humanos colectadas por punción intravenosa, se prepararon en alícuotas de 1 mL y se conservaron a -20 °C. La seropositividad al anti-VHC se determinó mediante el UMELISA HCV (CIE, Cuba) y la positividad al ARN del VHC mediante el UMELOSA HCV CUALITATIVO (CIE, Cuba). Las muestras incluidas en el estudio de genotipo se caracterizaron mediante los ensayos *Linear Array hepatitis C virus genotyping test*, *COBAS AMPLICOR HCV Test v 2.0* y *COBAS AmpliPrep/ COBAS TaqMan HCV test* de Roche Diagnostics (Alemania). El desglose de las muestras se presenta en la Tabla 2.2.

Para estudiar la especificidad analítica de los ensayos cualitativo y cuantitativo se dispuso de 38 muestras procedentes del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), negativas al anti-VHC por UMELISA HCV (CIE, Cuba) y positivas confirmadas a los patógenos: VHA (7), VHB (7), VIH 1/2 (8), VLTH I (2), dengue (5), *Trypanosoma cruzi* (5), fiebre amarilla (cepa viral de referencia en cultivos celulares 17D) (1) y encefalitis de San Luis (cepa viral en cultivos celulares) (1) y a la hepatitis autoinmune (2). Dos muestras fueron cultivos celulares (fiebre amarilla y encefalitis de San Luis) y el resto sueros.

Tabla 2.2. Características de las muestras utilizadas en las pruebas de validación de los ensayos UMELOSAs

Ensayos	Tipo de muestras seropositivas al VHC(*)	Tipo de muestras seronegativas al VHC(*)	Lugar de Procedencia	Prueba de validación	Acápites
Cualitativo	-	Plasmas: 68 Sueros: 50	BSM, La Habana, Cuba	Especificidad clínica	2.2.9.1
Cualitativo	Plasmas: 28 Sueros: 28	Plasmas: 93 Sueros: 95	BSM, La Habana, Cuba	Tipo de muestra	2.2.9.1
Cualitativo	Sueros: 11 (10 000 UI/mL) y 8 (5 000 UI/mL)	Sueros: 11	Gastroenterología del CIMEQ, La Habana, Cuba	Robustez	2.2.9.5
Cualitativo	Plasmas: 26 (BSM) Sueros: 56 (45 IGE y 11 BSM)	-	IGE y BSM, La Habana, Cuba	Comparación vs UMELISA HCV	2.2.9.6
Cualitativo	Sueros: 53	Sueros: 12	IGE, La Habana, Cuba	Comparación vs ensayo comercial	2.2.9.10
Cuantitativo	-	Plasmas: 22 Sueros: 22	BSM, La Habana, Cuba	Especificidad clínica	2.2.9.1
Cuantitativo	Sueros: 12 (2 cada genotipo del 1 al 6)	-	Panel de Genotipado 02/202 del NIBSC	Sensibilidad genotípica	2.2.9.3
Cuantitativo	Sueros: 35 (24 CIGB y 11 LISIDA) [genotipos: 1(21), 2(6), 3(5) y 6(3)]	-	LISIDA, Mayabeque; CIGB, La Habana, Cuba	Especificidad y exactitud genotípica Comparación vs ensayo comercial	2.2.9.3
Cuantitativo		Sueros: 9	BSM, La Habana, Cuba	Robustez	2.2.9.5
Cuantitativo	Sueros: 51		IGE, La Habana, Cuba	Comparación vs ensayo comercial	2.2.9.10

Leyenda: BSM, Banco de Sangre de Mariano; CIMEQ, Centro de Investigaciones Médico Quirúrgicas, IGE, Instituto de Gastroenterología; LISIDA, Laboratorio de Investigaciones del SIDA; CIGB, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. (*) Todas las muestras se conservaron a -20 °C en alícuotas de 1 mL.

2.1.3. Equipos

En este trabajo se utilizó el siguiente equipamiento: agitador magnético con calentamiento 0-100 °C (IKAMAG, Alemania); agitador orbital (*Maxi Mix II, Thermolyne*, EE.UU.); centrífuga refrigerada 5734R y termociclador con gradiente AG 22331 (*Eppendorf*, Alemania); incubadora de 37 °C (*Retomed - Sakura*, Cuba-Japón); pHmetro/ conductímetro 86505 (*MRC*, China); transiluminador de luz U.V. (*Spectroline®*, EE.UU.); fuente de electroforesis (LKB, Alemania); lector de placas PR-621 y lavador automático MW 2001 (SUMA, Cuba).

2.1.4. Diseño y síntesis de oligonucleótidos cebadores

Para amplificar el genoma del VHC mediante el UMELOSA HCV CUALITATIVO se emplearon tres cebadores comerciales (Okamoto et al., 1990) de GENSET (París, Francia) y un cebador nuevo (VHC 12n). Para el ensayo UMELOSA VHC CUANTITATIVO se diseñaron los cebadores Q1 y Q2, el uso de estas secuencias para el diagnóstico, no estaban descritas en la bibliografía consultada y fueron motivos de la Patente 23530, otorgada por la OCPI en el 2010 (ANEXO 10). Los tres nuevos cebadores se diseñaron en el Laboratorio de Biología Molecular del CIE y se evaluaron por el programa de análisis de oligonucleótidos OLIGO v.5.0 (*Molecular Biology Insights Inc.*, Cascade, EE.UU). Se sintetizaron según el método de Beaucage y Caruthers de 1981, por el Grupo de Síntesis de Oligonucleótidos de Química-Física del CIGB y se purificaron por HPLC según Arghavani y Romano en 1995.

2.1.5. Sondas de captura diseñadas para la hibridación por el SUMA

Para la hibridación en el SUMA del ensayo cualitativo, se diseñaron en el CIE, cuatro sondas de captura del producto amplificado:

a) Q3 y Q3-NH₂: directas, 24 nt, RNC 5' del VHC 83-107, con y sin un grupo amino en el extremo 5': 5' (NH₂-) CCA TGG CGT TAG TAT GAG TGT CGT 3'

b) Q4 y Q4-NH₂: inversas 22 nt, RNC 5' del VHC 154-133, con y sin un grupo amino en el extremo 5': 5' (NH₂-) CCG CAG ACC ACT ATG GCT CTC C 3'

Para la hibridación en el SUMA del ensayo cuantitativo, se diseñaron en el CIE, dos sondas de captura del producto amplificado:

a) Q5-NH₂: de captura específica al VHC, directa, 30 nt, RNC 5' del VHC, con grupo amino en el extremo 5': 5' NH₂-TCG TGC AGC CTC CAG GAC CCC CCC TCC CGG 3'

b) S1-NH₂: de captura de secuencia heteróloga al VHC para detectar el EI, directo, 25 nt, aminado en 5': 5' NH₂-TAG TTG AAT TGA AAG TGC CCG ACA T 3'.

Todas las sondas de ambos ensayos se diseñaron y evaluaron mediante el programa de análisis de oligonucleótidos OLIGO v.5.0 (*Molecular Biology Insights Inc.*, Cascade, EE.UU). Las mismas se sintetizaron por el Grupo de Síntesis de Oligonucleótidos de Química-Física del CIGB, según el método de Beaucage y Caruthers, 1981 y se purificaron por HPLC según Arghavani y Romano, 1995.

2.1.6. Plásmidos para la Transcripción *in vitro* de ARN con secuencia de VHC y del EI

Para la síntesis del ARN del VHC por transcripción *in vitro* (TinV) se utilizó el plásmido pCOE1 que contiene la secuencia de las regiones 5' NC, cápsida y E1 del VHC genotipo 1b de un aislamiento viral cubano (Morales *et al.*, 2000), que es amplificable por los cebadores Q1 y Q2. La síntesis del ARN del EI por TinV utilizó el plásmido pSIA que contiene un fragmento codificante para la proteína p64K de *Neisseria meningitidis* (Duarte *et al.*, 1998), que forma la secuencia interna del EI, flanqueada por zonas que hibridan con los iniciadores Q1 y Q2. El Departamento de Hepatitis C del CIGB suministró ambos plásmidos.

2.2. Métodos generales

2.2.1. Procedimientos para la toma de suero o plasma humano

Para obtener suero o plasma humano se realizó punción intravenosa para extraer 3,5 mL de sangre total: se mezclaron bien 1,5 mL de sangre con 150 µL de anticoagulante CPDA-1 (solución a pH 5,7 de fosfato de sodio monobásico monohidratado 0,14 g, dextrosa anhidra 1,83 g, citrato de sodio dihidrato 1,66 g, adenina 0,0173 g y ácido cítrico monohidratado 0,206 g) y se centrifugó a 2500 g por 5 minutos (min), de donde se obtuvo el plasma. Otros 2 mL de sangre se incubaron a 37 °C durante 30 min, luego se centrifugó a 2500 g por 5 min y el sobrenadante obtenido fue el suero. Se prepararon alícuotas de 330 µL de cada muestra y se conservaron a -20 °C. Este procedimiento se realizó según lo normado en el Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los Bancos de Sangre, Organización Panamericana de la Salud, EE.UU. (Cura y Wendel, 1994).

2.2.2. Ensayo diagnóstico UMELISA® HCV (3^a generación)

El UMELISA® HCV se utilizó para la detección de anticuerpos contra el VHC en todas las muestras de suero y plasma colectadas (utiliza solo 5 µL). Consiste en un ensayo inmunoenzimático indirecto donde la fase sólida es una placa de ultramicroELISA recubierta con péptidos sintéticos correspondientes a las regiones Core, NS4 y NS5, y una proteína recombinante de la región NS3 del VHC. Los anticuerpos específicos contenidos en las

muestras seropositivas se fijan a los antígenos del recubrimiento. Se lava la placa para eliminar los componentes no fijados y se añade un conjugado Anti-IgG Humana/Fosfatasa Alcalina (FA) que se une al complejo formado previamente sobre la fase sólida, en caso de una reacción positiva. Se elimina el conjugado en exceso mediante un lavado y, por último, se añade el sustrato fluorogénico 4-Metilumbeliferil fosfato, que se hidroliza por la acción de la FA. La intensidad de la fluorescencia emitida es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el VHC en la muestra. Una muestra se considera Positiva: Si $(Fi-BB) / (P-BB) \geq 0,300$, donde: Fi = Fluorescencia de la muestra; BB: Valor promedio del Blanco; P: Fluorescencia media del Control Positivo del ensayo. La sensibilidad para suero y plasma es del 100 % y la especificidad es de 99,5 % (Instructivo del ensayo UMELISA[®] HCV, 2011, TecnoSUMA, Cuba).

2.2.3. Ensayos de referencia "Estándar de Oro"

Los ensayos *AMPLICOR[®] Hepatitis C Virus Test v 2.0* (cualitativo para 96 pruebas) y *AMPLICOR HCV MONITOR[®] Test v 2.0* (cuantitativo para 24 pruebas), ambos de *Roche Diagnostics GMBH* (Alemania), fueron la referencia en los estudios de concordancia con los ensayos respectivos. En la prueba cualitativa el ARN del VHC se aísla de suero o plasma mediante lisis de los viriones con un agente caotrópico. Un ARN de control interno del VHC se añade a cada muestra mediante la solución de lisis para servir como control de extracción y de amplificación. Los ARN del VHC y del control interno se someten a RT-PCR, los productos amplificados resultantes están marcados con biotina, se hibridan a placas recubiertas con sondas específicas para el VHC y el control interno, respectivamente. Luego se añade un conjugado avidina-peroxidasa que se une a los productos amplificados; seguidamente se adiciona un sustrato que, por la acción de la enzima, forma un complejo coloreado. Por último, se lee la absorbancia a 450 nm (Instructivo del ensayo *AMPLICOR[®] HCV Test, v 2.0, Roche MS Inc., 2001*).

En el ensayo cuantitativo el procedimiento es muy similar, solo que en la solución de lisis se añade una cantidad conocida de moléculas de ARN del estándar de determinación cuantitativa del VHC. La relación entre la señal obtenida para el ARN del VHC y la señal obtenida para el estándar determinará la cantidad de ARN del VHC presente en la muestra en UI/mL (Instructivo del ensayo *AMPLICOR HCV MONITOR[®] Test, v 2.0, Roche MS Inc., 2004*).

2.2.4. Electroforesis en gel de agarosa

Método de separación de moléculas de ADN en geles de agarosa (Tipo I de baja electroendosmosis, Promega, EE.UU.) disuelta al 2 % (p/v) en una solución de Tris-Borato 40 mmol/L, EDTA 1 mmol/L y bromuro de etidio a 0,5 mg/mL (TBE). Antes de ser aplicadas en el gel las muestras se mezclaron en proporción 4:1

(v/v) con el colorante de carga Naranja G (*Merck*, Alemania); la corrida electroforética se realizó a 120 volts durante 30-45 min. Para la detección de la banda de interés, se aplicó el patrón de peso molecular Marcador de ADN pGEM (676 pb, 517 pb, 460 pb, 396 pb, 350 pb, 222 pb, 179 pb, 126 pb y 75 pb) (*Promega*, EE.UU.). Las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz UV (*Sambrook y Russel*, 2001). Este procedimiento se utilizó como referencia para la detección de los amplicones del VHC en el ensayo cualitativo. Este procedimiento también sirvió para la extracción de bandas de ADN durante la obtención de los transcriptos. Se corrieron los fragmentos de ADN (productos de PCR) en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (*Promega*, EE.UU.) disuelta al 2 % (p/v) en TBE. Antes de ser aplicadas en el gel, las muestras se mezclaron en proporción 5:1 (v/v) con el colorante de carga Naranja G (*Merck*, Alemania); la corrida electroforética se realizó a 80 volts durante una hora, en la oscuridad. Terminada la corrida, se observó el gel en un transiluminador de luz UV, se seleccionó la banda de interés y se cortó la zona del gel que la contenía (*Sambrook y Russel*, 2001). Se extrajo el fragmento de ADN del gel mediante el estuche comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems* (Instructivo del estuche *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System*, *Promega*, EE.UU., 2004).

2.2.5. Métodos de extracción del ARN del VHC a partir de suero y plasma humano

Para el ensayo cualitativo de detección del ARN del VHC, se evaluó un Método de Extracción de Referencia (MER) (*Chomczynski*, 1993) y un nuevo Método de Extracción Optimizado (MEO) en este trabajo, ambos descritos en la figura 2.1.

MER: 300 µL de suero o plasma humano se mezclaron con 900 µL de solución desnaturalizante (tiocianato de guanidinio 4 mol/L, citrato de sodio 25 mmol/L, 2-mercaptoetanol 100 mmol/L y sarcosil 0,5 %). Luego se les añadió acetato de sodio 2 mol/L, fenol y cloroformo: alcohol isoamílico (relación v/v 49:1). Se centrifugó a 12 000 g por 20 min a 4 °C, luego se extrajo la fase acuosa a la cual se le añadieron 700 µL de isopropanol para precipitar el ARN. Se procedió a centrifugar a 12 000 g por 15 min a 4 °C y a eliminar el sobrenadante. El ARN se resuspendió en 700 µL de etanol al 75 % y se centrifugó a 12 000 g por 10 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado. Finalmente, el precipitado se secó al vacío y se resuspendió en 50 µL de agua libre de RNasas (Figura 2.1.A).

MEO: 150 µL de suero/plasma se mezclaron con 500 µL de TL (además de tampón de lisis es una solución

estabilizadora de ácidos nucleicos que contiene: tiocianato de amonio 0,2-2 mol/L; tiocianato de guanidina 0,2-2 mol/L; fenol 30-60 %; glicerol 5-10 %; acetato de sodio 0,1-0,8 mol/L pH 4-11 y un ARN heterólogo (ARNh) de 0,01-1 mg/mL, Patente OCPI: No.23588, 2010). Luego se les añadió cloroformo y se centrifugó a 12 000 g por 15 min a TA. Se extrajo la fase acuosa a la cual se le añadieron 500 µL de isopropanol para precipitar el ARN. Se procedió a centrifugar a 12 000 g y a eliminar el sobrenadante. El ARN se resuspendió en 500 µL de etanol al 75 % y se centrifugó a 12 000 g por 5 min a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el mismo lavado pero con acetona. Finalmente, el precipitado se secó por 15 min a TA y se resuspendió en 20 µL de agua libre de RNasas (Figura 2.1.B).

Para comparar ambos métodos de extracción se utilizaron: tres controles negativos (CN) y el ERS CP52 a 50, 100, 500, 1 000 y 5 000 UI/mL. Luego se sometió el ARN al método de amplificación optimizado (MAO, descrito en el acápite 2.2.6.1) y los resultados se visualizaron en un gel de agarosa al 2 % (acápite 2.2.4).

Para el **ensayo cuantitativo** de determinación de la carga viral del ARN del VHC, se utilizó el MEO, con la variante que el estándar interno está incluido dentro del TL, a una dilución adecuada de competencia con el VHC, de forma tal que se favorezca la detección fluorescente del VHC sobre el EI, este procedimiento se explica en el acápite 2.2.6.3.3.

2.2.6. Métodos de amplificación

2.2.6.1. Métodos de amplificación del ensayo cualitativo: RT-PCR y PCR anidada

Método de Amplificación de Referencia (MAR): Se utilizaron las parejas de cebadores comerciales HCV01V/I-HCV01V/II en la RT-PCR y HCV01V/33-CV01V/48-Biotinilado en la PCR anidada (PCR2). Se empleó el método de amplificación utilizado por Okamoto y colaboradores en 1990. Las enzimas RT AMV y *Taq* Polimerasa, el MgCl₂ y el tampón de reacción 10X (Tris 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, pH 8,3) procedieron de Boehringer Mannheim GmbH, Alemania (Tabla 2.3). Volumen de ARN molde para RT-PCR: 20 µL; volumen de ADNc para PCR2: 50 µL; volumen final de reacción: 100 µL.

Tabla 2.3. Condiciones de la RT-PCR y PCR2 del MAR y MAO (concentración final de cada reactivo en la mezcla)

Cebador/ Ensayo	Cebador sec. (5'-3')	Método	RT-PCR o PCR2 (°C) 40 ciclos	C(Cebad.) μmol/L	C(Taq Pol) U/μL	C(RT AMV) U/μL	C(RNasin) U/μL	C(dNTP) mmol/L	C(MgCl ₂) (mmol/L)
HCV01V/II* / RT-PCR (directo)	5' ACT CCA CCA TGA ATC ACT CCC 3'	MAR/ MAO	42/95/50/72/ 45/95/50/72	1,5/ 0,5	2,5/0,035	0,5/0,1	--/0,3	0,5/0,25	1,5/2,5
HCV01V/II* / RT-PCR (inverso)	5' AAC ACT ACT CGG CTA GCA GT 3'	MAR	42/95/50/72	1,5	2,5	0,5	----	0,5	1,5
VHC 12n** / RT-PCR (inverso)	5' ACC CAA CAC TAC TCG GCT AG 3'	MAO	45/95/50/72	0,5	0,035	0,1	0,3	0,25	2,5
HCV01V/33 */ PCR2 (directo)	5' TTC ACG CAG AAA GCG TCT AG 3'	MAR/ MAO	95/50/72	1,5/ 0,5	2,5/0,035	----	----	0,3/0,25	1,5/2,5
HCV01V/48 B*/ PCR2 (inverso)	B-GTT TAT CCA AGA AAG GAC CC 3'	MAR/ MAO	95/50/72	1,5/ 0,5	2,5/0,035	----	----	0,3/0,25	1,5/2,5

Leyenda: *Cebadores comerciales GENSET (París, Francia); **Cebador diseñado en el Laboratorio de Biología Molecular del CIE; MAR: Método de amplificación de referencia (rojo); MAO: Método de amplificación optimizada (azul). RT-PCR o PCR2 (°C): Muestra las temperaturas de desnaturalización/ hibridación/ extensión de la PCR para cada cebador. C(X): concentración de cada componente de las mezclas de RTPCR y PCR2.

Método de Amplificación Optimizada (MAO): A partir del MAR se diseñaron nuevas condiciones donde: 1) se variaron las concentraciones de enzimas, dNTPs y MgCl₂, 2) se adicionó un inhibidor de RNasas (*RNasin*, Promega, EE.UU.), 3) se redujo el volumen final de reacción de 100 a 30 μL y de ARN molde de 20 a 5 μL y 4) se sustituyó el cebador comercial HCV01V/II por el VHC 12n (ver Tabla 2.3).

Para comparar ambas condiciones de amplificación, mediante el MEO se extrajo ARN de tres CN y el ERS CP52 a las concentraciones de 100, 500 y 5000 UI/mL (Figura 2.1.B). La amplificación se realizó según las condiciones establecidas en la Tabla 2.3. La detección se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (acápite 2.2.4). La talla esperada del producto de la PCR2 fue de 144 pb.

Al conformar los reactivos utilizados en la etapa de amplificación del ARN del VHC en el estuche diagnóstico, se prepararon mezclas de reacción listas para el uso, a las que solo es necesario añadirles agua libre de RNasas y las enzimas antes de utilizarlas para disminuir los riesgos de contaminación (Aslanzadeh, 2004; Liegler y Grant, 2006).

2.2.6.2. Diseño del cebador VHC 12n y evaluación de la sensibilidad para los genotipos 1 y 3

2.2.6.2.1. Evaluación de la sensibilidad de los cebadores comerciales de la RT-PCR

Para evaluar la sensibilidad de la RT-PCR con dos cebadores comerciales, se empleó el panel de sensibilidad *Pellicheck HCV-RNA*, que contiene diluciones de muestras de suero con VHC de los genotipos 1 y 3, así como el Control de Corrida (RC) 96/586 a 7,1, 71 y 710 UI/mL de ARN del VHC de genotipo 3. Todas las muestras se procesaron con la extracción y la hibridación optimizadas y la amplificación por MAR (ver en acápite 2.2.5, 2.2.7 y 2.2.6.1). Se consideró positiva la muestra que tuviera un valor de fluorescencia tres veces superior a la fluorescencia media del CN.

2.2.6.2.2. Diseño del nuevo cebador VHC 12n

Se rediseñó la secuencia del cebador inverso HCV01V-II (ver Tabla 2.3) para aumentar la sensibilidad del ensayo en la detección de los genotipos 1 y 3. Para ello se realizó un alineamiento múltiple de secuencias (*CLUSTAL W v 1.8 (University College Dublin, Irlanda)*) de la región 5'NC del VHC (nt 250 al 289), con datos procedentes de la Base de datos de secuencias de ácidos nucleicos (*EMBL Nucleotide Sequence Database, Heidelberg, Alemania, 2000; <http://www.embl-heidelberg.de>*) y se seleccionó una zona donde existiera una secuencia conservada para todos los genotipos evaluados. La secuencia rediseñada (cebador VHC 12n) se evaluó con el programa de análisis de oligonucleótidos OLIGO v.5.0 (*Molecular Biology Insights Inc., Cascade, EE.UU.*), para determinar si cumplía con las características adecuadas para un cebador como: no formación de lazos, ni horquillas, ni heterodímeros, así como el cálculo de la temperatura de fusión (T_m , temperatura teórica a la que hibrida el cebador a la cadena de ARN/ADNc durante la RT-PCR).

2.2.6.2.3. Comparación de los cebadores HCV01V-II y VHC 12n para los genotipos 1 y 3

Para esta comparación se empleó el panel de sensibilidad *Pellicheck HCV-RNA* que contiene diluciones de muestras de suero con VHC de los genotipos 1 y 3, así como el Control de Corrida (RC) 96/586 a 7,1; 71 y 710 UI/mL de ARN del VHC de genotipo 3. Todas las muestras se procesaron con la extracción, amplificación e hibridación optimizadas (ver en acápite 2.2.5, 2.2.6.1 y 2.2.7). Se consideró positiva la muestra que tuviera un valor de fluorescencia tres veces superior a la fluorescencia media del CN.

2.2.6.3. Amplificación del ensayo cuantitativo: RT-PCR competitiva

Se utilizaron los cebadores Q1 y Q2 en una RT-PCR competitiva entre la secuencia VHC y la secuencia del EI (Tabla 2.4). Las enzimas RT AMV, RNasin, Taq Polimerasa y el tampón de reacción 10X (Tris 10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, pH 8,3) proceden de Promega, EE.UU. Volumen de ARN molde para RT-PCR: 5 µL; volumen final de reacción: 30 µL.

Tabla 2.4. Condiciones de la RT-PCR competitiva: concentración final de cada reactivo en la mezcla

Cebador/ Ensayo	Cebador sec. (5'-3')	RT-PCR (°C) 40 ciclos	C(Cebad.) µmol/L	C(Taq Pol) U/µL	C(RTAMV) U/µL	C(RNasin) U/µL	C(dNTP) mmol/L	C(MgCl ₂) (mmol/L)
Q1**/ RT-PCRc (directo)	5' CAC TCC CCT GTG AGG AAC TAC TGT CT 3'	45/95/67/72	1,0	0,035	0,12	0,3	0,25	1,5
Q2**/ RT-PCRc (inverso)	5' Biot-ACT CAC CGG TTC CGC AGA CCA CTA 3'	45/95/67/72	1,0	0,035	0,12	0,3	0,25	1,5

Leyenda: **Cebadores diseñados en el Laboratorio de Biología Molecular del CIE; RT-PCR (°C): Muestra las temperaturas de desnaturalización/ Hibridación/ Extensión de la PCR para cada cebador. C(X): concentración de cada componente de la mezcla de RTPCR.

2.2.6.3.1. Selección de la concentración óptima de los cebadores Q1 y Q2

Los cebadores Q1 y Q2 de la amplificación se evaluaron a 0,5 y 1 µmol/L. A cuatro réplicas del CN y del ERS CP1107 a 5 000 UI/mL se les realizó el aislamiento del ARN según el MEO (acápites 2.2.5) con EI en el TL a una concentración de 1,8 pg/µL (acápites 2.2.6.3.3.). Luego se amplificaron por RT-PCR competitiva (acápites 2.2.6.3) con los cebadores en las dos concentraciones antes mencionadas. Se empleó una temperatura de hibridación de 67 °C, determinada para ambos cebadores con el programa OLIGO v.5.0 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, EE.UU.). La detección se realizó según acápites 2.2.8. Los resultados se analizaron según lo planteado en los acápites 2.2.8.3 y 2.2.8.4.

2.2.6.3.2. Preparación de los transcritos de VHC y EI

2.2.6.3.2.1. Síntesis de los ARN sintéticos de VHC y EI por el método de transcripción in vitro

Primero se clonaron los fragmentos de ADN del VHC y del EI en el pGEM[®]-T Vector (Promega, EEUU). Para ello se amplificaron por PCR los fragmentos flanqueados por los cebadores Q1 y Q2 de los plásmidos pCOE1

(para VHC) y pSIA (para EI). Se realizó una electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (*Promega*, EE.UU.) al 2 % para extraer las bandas de ADN de doble cadena (ver acápite 2.2.4), que se clonaron en el vector *pGEM-T* mediante el estuche *pGEM[®]-T Vector System* (Instructivo del estuche *pGEM[®]-T Vector System*, *Promega*, EE.UU. 2003), en la región colindante al promotor de la ARN polimerasa *T7*. Con cada producto de ligamiento por separado, se procedió a transformar células competentes de la cepa *XL-1 Blue de Escherichia coli* (*Stratagene*, Francia) y se crecieron en medio de cultivo sólido *Luria Bertani* (LB) con agar y ampicilina (50 µg/mL) a 37 °C durante 14 h. Una vez seleccionadas las colonias portadoras de plásmidos con insertos, se procedió a crecerlas en medio de cultivo líquido LB con ampicilina (50 µg/mL) a 37 °C por 14 h en agitador orbital, luego los plásmidos se purificaron según el instructivo del ensayo del sistema *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (*Promega*, EE.UU., 2005). Por último, se seleccionaron los clones que portaban el vector T, con la banda de interés, en la orientación deseada. Para ello se realizaron reacciones de PCR con dos parejas de iniciadores y se sometieron los productos amplificados a electroforesis en geles de agarosa al 2 % (ver acápite 2.2.4).

Los plásmidos recombinantes que portaban las secuencias de VHC y EI se digirieron con la endonucleasa *MluI* para que sirvieran de molde a la enzima ARN polimerasa *T7*. Las reacciones de transcripción *in vitro* se ejecutaron según el manual del estuche *Riboprobe[®] in vitro Transcription Systems* (*Promega*, EE.UU., 2005). Los productos de ambas reacciones (TEI-0309 y TVHC 0309-1) se purificaron y se les determinó su concentración mediante absorbancia a 260 nm. Se seleccionaron aquellos transcritos que evidenciaron una concentración entre 200 y 1000 µg/mL (McKenna *et al.*, 2007). Los transcritos se conservaron diluidos 1:4 (v/v) en el TL, solución estabilizadora de ARN empleada en el MEO (acápite 2.2.5).

2.2.6.3.3. Determinación de la concentración óptima de competencia del transcripto EI

En la RT-PCR competitiva se emplea una curva de cuantificación de VHC y del EI. Para la construcción del estándar de cuantificación se empleó el transcripto TVHC 0309-1 (C1: $1,44 \times 10^3$ UI/mL, C2: $1,12 \times 10^4$ UI/mL, C3: $2,81 \times 10^5$ UI/mL), un CN y un Control de Calidad (CC) a una concentración de 12 000 UI/mL (intervalo de confianza de 3 715 UI/mL a 38 000 UI/mL, equivalente a $\pm 0,5 \text{ Log}_{10}$), con el objetivo de determinar la exactitud del ensayo. Se hicieron tres diluciones v/v del EI (TEI-0309, 72 µg/µL) en TL ($1:4 \times 10^6$, $1:4 \times 10^7$ y $1:4 \times 10^8$, que equivalen a las concentraciones 18 pg/µL, 1,8 pg/µL, 0,18 pg/µL, respectivamente) para

determinar la concentración óptima de competencia. Con estas tres diluciones del EI en TL, se realizó la extracción de ARN mediante el MEO (acápite 2.2.5) de los tres puntos de la curva, el CN y el CC. Con 5 µL de ARN aislado más 25 µL de mezcla de RT-PCR preparada según la Tabla 2.4 se procedió a realizar la amplificación simultánea de ARN del VHC y del EI. La detección se realizó según el acápite 2.2.8. Los resultados se analizaron según lo planteado en los acápites 2.2.8.3 y 2.2.8.4.

2.2.7. Método de detección cualitativa (MDC) del ARN del VHC mediante el SUMA

El método de detección cualitativa (MDC) del producto amplificado consistió en la hibridación en formato UMELOSA (*Ultra Micro-analytic Enzyme-Linked Oligo-Sorbent Assay*, siglas del inglés) (Figura 2.2). Las características fundamentales de dicho método de detección son la utilización de una sonda de captura diseñada en el CIE (ver acápite 2.1.5) y el empleo de bajos volúmenes de muestras (5 µL) y reactivos (10 µL). Se añadió un indicador de pH (rojo fenol al 0,02 %), a la solución de desnaturalización (pH básico, color fucsia) que permite apreciar un cambio de coloración al neutralizarse (pH neutro, amarillo). El MDC se describe a continuación.

A los pocillos de las ultramicroplacas (umplacas) de poliestireno blanco con dióxido de zinc, de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Alemania) recubiertas con la sonda de captura Q3-NH₂ a 2 ng/µL, se les añadieron 10 µL de la solución de desnaturalización (NaOH 0,5 mol/L, NaCl 1,5 mol/L, rojo fenol al 0,02 %) y 5 µL de ADN marcado con biotina y amplificado según el MAO descrito en el acápite 2.2.6.1, se mezclaron y se incubaron 10 min a 37 °C. Se adicionaron 15 µL de solución neutralizante (HCl 2 mol/L) 1:1 (v/v) con solución de hibridación (pH 7,2) (SDS 0,4 %, NaCl 1,5 mol/L, citrato de sodio 0,15 mol/L). Las umplacas se incubaron 2 h a 37 °C, se lavaron cuatro veces con solución de hibridación diluida 1:4 (v/v) con agua destilada y se les aplicaron 30 µL de conjugado Estreptavidina/Fosfatasa Alcalina (1:30 000), obtenido por el método del glutaraldehído (concentración: 1 mg de Estreptavidina por cada mL de conjugado) (Tijssen, 1993). Las umplacas se lavaron cuatro veces y se les añadieron 30 µL del sustrato 4-metil-umbeliferil fosfato (0,005 mol/L) cuya hidrólisis enzimática produjo 4-metil-umbeliferona. Todos los reactivos fueron de calidad analítica (Sigma-Aldrich, EE.UU.). La lectura se realizó en el lector de fluorescencia PR-621 y la evaluación e interpretación de los mismos se efectuó mediante el programa *Strips Reader Software* (SRS) versión 9.18 (UMELOSA® HCV CUALITATIVO) (CIE, Cuba). ANEXO 1.

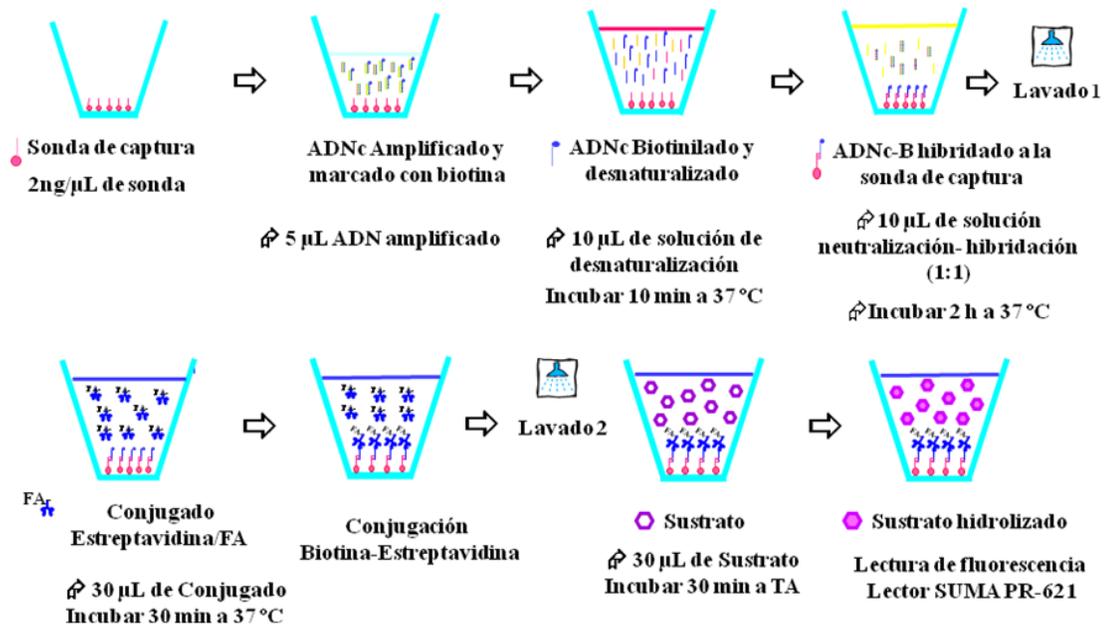


Figura 2.2. Esquema de hibridación del ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO: A los pocillos de las ultramicropelículas recubiertas con la sonda de captura Q3-NH₂, se les añadieron 10 µL de la solución de desnaturalización y 5 µL de ADN amplificado y marcado con biotina, se mezclaron y se incubaron 10 min a 37 °C. Se adicionaron 15 µL de solución neutralizante 1:1 (v/v) con solución de hibridación. Se incubaron 2 h a 37 °C, se realizaron cuatro lavados con solución de hibridación diluida 1:4 (v/v) con agua destilada y se aplicaron 30 µL de conjugado Estreptavidina/Fosfatasa Alcalina. Se lavaron cuatro veces y se añadieron 30 µL del sustrato 4-metil-umbeliferil fosfato cuya hidrólisis enzimática produjo 4-metil-umbeliferona. La lectura se realizó en el lector de fluorescencia PR-621 y la evaluación e interpretación de los mismos se efectuó mediante el programa SRS v 9.18 (UMELOSA® HCV CUALITATIVO). ANEXO 1.

2.2.7.1. Selección de la sonda de captura para el recubrimiento de las placas

Se diluyeron las sondas de captura Q3, Q4, Q3-NH₂ y Q4-NH₂ a 2,5 ng/µL, en glutaraldehído al 0,025 % y carbonato de sodio 0,1 mol/L a pH 9,0. Se recubrieron las umplacas con 30 µL por pozo de cada mezcla. Después de cuatro horas de incubación a 20-25 °C en cámara húmeda, se realizó un lavado de las placas con una solución de Tween-20 al 0,05 % y un bloqueo posterior con glicina 0,2 mol/L durante dos horas a 20-25 °C en cámara húmeda. Finalmente, se procedió al secado de las placas durante dos horas a 37 °C. Para la selección de la sonda y de las condiciones de recubrimiento se evaluaron cuatro réplicas del ERS CP1107 a 500 UI/mL y del CN, a las cuales se les realizó el aislamiento del ARN según el MEO (acápites 2.2.5) y su posterior amplificación por el MAO (acápites 2.2.6.1). Los productos amplificados se detectaron según lo descrito en el acápites 2.2.7 y los resultados se interpretaron según el acápites 2.2.7.4.

2.2.7.2. Selección de la concentración óptima de la sonda de captura

Se evaluó la sonda de captura a diferentes concentraciones de recubrimiento: 1,5; 1,75; 2,0; 2,25 y 2,5 ng/μL, diluída en carbonato de sodio 0,1 mol/L a pH 9. Se recubrieron las umplacas con cada una de las tres concentraciones a 30 μL por pozo. Después se continuó el proceso como se describe en el acápite 2.2.7.1. Para la selección de la mejor concentración de recubrimiento se evaluaron cuatro réplicas del ERS CP1107 a 500 UI/mL y del CN, a los cuales se les realizó el MEO y su posterior amplificación por el MAO. La detección se realizó según el acápite 2.2.7 y los resultados se interpretaron según el acápite 2.2.7.4.

2.2.7.3. Composición del estuche de reactivos del UMELOSA® HCV CUALITATIVO

El ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO contiene reactivos suficientes para 96 pruebas y son suministrados en dos cajas, la **Caja 1** y la **Caja 2**.

CAJA 1		CAJA 2	
ESTUCHE DE EXTRACCIÓN		CONTROLES DEL ENSAYO	
Contenido	Cantidad	Contenido	Cantidad
E1-Tampón de Lisis	2 x 25 mL	E3- Control Negativo	4 x 0,75 mL
ESTUCHE DE DETECCIÓN		E4- Control Positivo	4 x 0,35 mL
Contenido	Cantidad	ESTUCHE DE AMPLIFICACIÓN	
Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	2	Contenido	Cantidad
R1-Solución de Desnaturalización	1 x 5 mL	A1- Mezcla RT-PCR	4 x 0,40 mL
R2-Solución Neutralizante	1 x 3,5 mL	A2- Enzimas RT-PCR	1 x 0,10 mL
R3-Solución de Hibridación	6 x 25 mL	A3- Mezcla PCR-2	4 x 0,46 mL
R4- Conjugado	1 x 0,4 mL	A4- Enzima PCR-2	1 x 0,04 mL
R5- Tampón Conjugado	1 x 8 mL	E2- Agua libre de RNasas	2 x 3,5 mL
R6- Sustrato	1 x 2 mL		
R7- Tampón Sustrato	1 x 18 mL		

2.2.7.4. Interpretación de los resultados del UMELOSA® HCV CUALITATIVO

Los resultados de la prueba deben ser analizados conjuntamente con la información de carácter clínico y otros datos analíticos disponibles, para un diagnóstico correcto de la infección.

- La muestra se considera **Positiva** (ARN del VHC detectado) cuando la media de los duplicados es igual o mayor que 140 UF. (Valor obtenido del análisis estadístico poblacional de 546 muestras positivas al ARN viral, donde se obtuvo una media de 200,8 UF ± 3DE (intervalo de confianza: 140,8 UF- 260,8 UF), con la particularidad de que el fluorímetro tiene un máximo de lectura de 210 UF).

Nivel de corte: $\frac{F1+F2}{2} \geq 140$.

Donde: F1: Fluorescencia de la réplica 1 de la muestra a evaluar.

F2: Fluorescencia de la réplica 2 de la muestra a evaluar.

- La muestra se considera **No detectable** cuando la media de los duplicados es igual o menor de 40 UF (Valor obtenido del análisis estadístico poblacional de 118 muestras negativas al ARN viral donde se obtuvo una media de 16,84 UF \pm 2,5DE (intervalo de confianza: 7,52 UF- 40,15 UF). Un resultado **No detectable** no excluye la presencia de infección por el VHC. Los resultados dependen de la correcta conservación de la muestra, ausencia de agentes inhibidores y que la cantidad de ARN en la misma sea igual o mayor que el límite de detección de la técnica.
- El resultado se considera **Indeterminado** cuando la media de los duplicados de la muestra es mayor que 40 y menor que 140 UF. En este caso, se recomienda **Repetir** la muestra desde el inicio.

2.2.8. Método de detección cuantitativa (MDQ) del ARN del VHC mediante el SUMA

El método de detección cuantitativa (MDQ) del producto amplificado consistió en la hibridación en formato UMELOSA®. Para ello se utilizaron dos sondas de captura diseñados por el CIE (ver acápite 2.1.5) y bajos volúmenes de muestras (6 μ L) y reactivos (9 μ L). Se añadió un indicador de pH (cristal punzó al 0,002 %), a la solución de desnaturalización (pH básico, color naranja claro) que permite apreciar un cambio de coloración al neutralizarse la mezcla (pH neutro, rosado). El MDQ se describe a continuación:

Los amplicones con secuencia de VHC y EI se capturaron, por duplicado, en tiras alternas de las umplacas recubiertas con las sondas Q5 y S1, respectivamente (Figura 2.3). Antes de la aplicación en los pocillos de la placa, se añadieron 60 μ L de la solución de desnaturalización a cada tubo de reacción y luego de una incubación por 10 min a 20-25 °C, se aplicaron 6 μ L de los productos amplificados desnaturalizados a los pocillos respectivos en la umplaca. Posteriormente se aplicaron 9 μ L de solución de neutralización 1:1 (v/v) con solución de hibridación y se incubó la umplaca durante una hora a 37 °C en cámara húmeda. Se lavó la umplaca cuatro veces con solución de hibridación 1:4 (v/v) y se añadieron 30 μ L del conjugado Estreptavidina/Fosfatasa Alcalina diluido 1:150 000, obtenido por el método del glutaraldehído (concentración: 1 mg de Estreptavidina por cada mL de conjugado) (Tijssen, 1993). Se incubó a 37 °C en cámara húmeda durante 30 min y luego de cuatro lavados, se le añadieron 30 μ L del sustrato 4-metilumbeliferil fosfato. Las señales de fluorescencia correspondientes a la hidrólisis del sustrato fueron detectadas por el lector de placas

PR-621 y la evaluación e interpretación de las mismas se realizó mediante el programa *Strips Reader Software* (SRS) versión 9.18 (UMELOSA® VHC CUANTITATIVO) (CIE, Cuba). ANEXO 2. Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica (Sigma-Aldrich, EE.UU.).

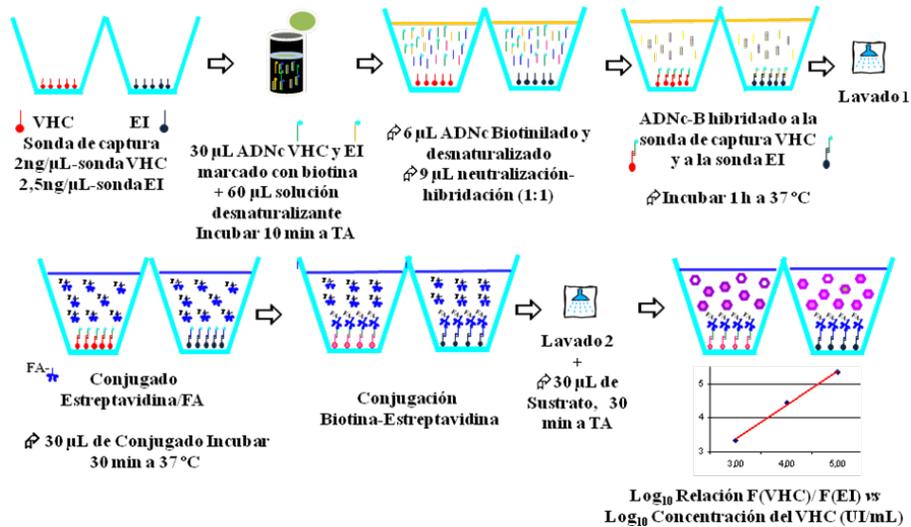


Figura 2.3. Esquema de hibridación del ensayo UMELOSA® VHC CUANTITATIVO: Los amplicones con secuencia de VHC y EI se capturaron, por duplicado, en tiras alternas de las umplacas recubiertas con las sondas Q5 y S1, respectivamente. Antes de la aplicación en los pocillos de la placa, se añadieron 60 μL de la solución de desnaturalización a cada tubo de reacción y luego de una incubación por 10 min a 20-25 °C, se aplicaron 6 μL de los productos amplificados desnaturalizados a los pocillos respectivos en la umplaca. Posteriormente se aplicaron 9 μL de solución de neutralización 1:1 (v/v) con solución de hibridación y se incubó la umplaca durante una hora a 37 °C en cámara húmeda. Se lavó la umplaca cuatro veces con solución de hibridación 1:4 (v/v) y se añadieron 30 μL del conjugado Estreptavidina/Fosfatasa Alcalina diluido 1:150 000. Se incubó a 37 °C en cámara húmeda durante 30 min y luego de cuatro lavados, se le añadieron 30 μL del sustrato 4-metilumbeliferil fosfato cuya hidrólisis enzimática produjo 4-metil-umbeliferona. La lectura se realizó en el lector de fluorescencia PR-621 y la evaluación e interpretación de los mismos se efectuó mediante el programa SRS v 9.18 (UMELOSA® VHC CUANTITATIVO). ANEXO 2

2.2.8.1. Selección de la concentración óptima de las sondas de captura Q5-NH₂ y S1-NH₂

Con carbonato de sodio 0,1 mol/L, pH 9 se diluyeron las sondas de captura Q5-NH₂ y S1-NH₂ a las concentraciones de recubrimiento 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5 y 2,75 ng/μL. Se recubrieron umplacas con cada una de las preparaciones a razón de 30 μL por pozo. Después se continuó el proceso como se describe en el acápite 2.2.7.1. Para la selección de la mejor concentración de recubrimiento, a tres réplicas del tercer punto de la curva estándar VHC (C3: 2,81x10⁵ UI/mL; Lote 1) y tres del CN se les realizó el aislamiento del ARN según el MEO (acápites 2.2.5). Se realizó la amplificación por RT-PCR competitiva (Tabla 2.4). La detección se realizó según el acápite 2.2.8 y los resultados se interpretaron según los acápites 2.2.8.3 y 2.2.8.4.

2.2.8.2. Composición del estuche de reactivos UMELOSA® VHC CUANTITATIVO

El ensayo UMELOSA® VHC CUANTITATIVO contiene reactivos suficientes para 48 pruebas suministrados en dos cajas, la Caja 1 y la Caja 2.

CAJA 1		CAJA 2	
REACTIVOS DE EXTRACCIÓN Y DETECCIÓN		EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN	
Contenido	Cantidad	Contenido	Cantidad
E1- Tampón de Lisis	1 x 25 mL	A1- Mezcla RT-PCR	2 x 0,4 mL
C1- Estándar VHC	2 x 1,2 mL	A2- Enzimas RT-PCR	1 x 0,07 mL
C2- Estándar VHC	2 x 1,2 mL	E2- Agua libre de RNasas	2 x 3,5 mL
C3- Estándar VHC	2 x 1,2 mL	E3- Control Negativo	4 x 0,75 mL
CC- Control de Calidad	2 x 1,2 mL		
R1- Solución de Desnaturalización	1 x 5 mL		
R2- Solución Neutralizante	1 x 3,5 mL		
R3- Solución de Hibridación	6 x 25 mL		
R4- Conjugado	1 x 0,4 mL		
R5- Tampón Conjugado	1 x 8 mL		
R6- Sustrato	1 x 2 mL		
R7- Tampón Sustrato	1 x 18 mL		
PVHC: Placa de 12 tiras x 8 pocillos recubierta con sonda del VHC			1
PEI: Placa de 12 tiras x 8 pocillos recubierta con sonda del Estándar interno			1

2.2.8.3. Algoritmo de cuantificación del VHC

El análisis cuantitativo de los resultados se realizó mediante la herramienta UMELOSA® VHC CUANTITATIVO incluida en el SRS versión 9.18 (TecnoSUMA, Cuba). La curva estándar de cuantificación se construyó por Regresión Lineal Ponderada, RLP (Montgomery, 1991) a partir de los logaritmos en base 10 de las concentraciones esperadas y los logaritmos en base 10 de la Relación ($\log_{10} R$): señal de fluorescencia procedente de los amplicones del VHC entre señal de fluorescencia procedente de los amplicones de EI; $R = UF(VHC)/UF(EI)$. Para estimar la concentración en UI/mL de los transcritos y las muestras, se interpolaron los valores de $\log_{10} R$ respectivos en la curva estándar de VHC con lo que se obtienen los logaritmos en base 10 de las unidades internacionales de ARN del VHC por mL de muestra ($\log_{10} UI/mL$) y, finalmente, la concentración de cada muestra en UI/mL.

2.2.8.4. Interpretación de los resultados del UMELOSA® HCV CUANTITATIVO

Los resultados de este ensayo serán dados de la siguiente forma:

- **No cuantificables (NC):** los resultados se encuentran por debajo del primer punto (< C1) o por encima del tercer punto de la curva de cuantificación del ensayo (> C3).
- **Cuantificable:** si se encuentran entre los valores mínimos (C1) y máximos (C3) de la curva estándar de cuantificación, incluyendo éstos.

2.2.9. Validación de los ensayos cualitativos y cuantitativos para suero y plasma

Para evaluar los ensayos cualitativos y cuantitativos se siguieron las recomendaciones de la Regulación No. 47-2007: Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores del Centro de Control Estatal de Medicamentos (CECMED-2007), Cuba; las Normas del Comité Europeo para Estándares de Laboratorios Clínicos (*European Committee for Clinical Laboratory Standards (ECCLS)*) y el Consenso Europeo de Estrasburgo de 1999. Los parámetros analizados fueron: especificidad, sensibilidad, comparación con paneles de referencia, reactividad cruzada y robustez.

2.2.9.1. Especificidad Clínica

Ensayo cualitativo: Se evaluaron 118 muestras seronegativas por el UMELISA HCV para la detección de anticuerpos al VHC: 50 sueros y 68 plasmas; entre ellos había 28 parejas de suero y plasma procedentes de igual número de donantes (ver Tabla 2.2). Las muestras se evaluaron en paralelo con el estuche UMELOSA® HCV CUALITATIVO y se calculó la Especificidad clínica (%) = $\frac{\text{Muestras Negativas (MN)}}{\text{Muestras Verdaderas Negativas (VN)}} \times 100$.

Donde: Verdaderas Negativas son las Muestras Negativas más las Falsas Positivas.

Para la comparación del tipo de muestra a emplear se estudiaron con el estuche UMELOSA® HCV CUALITATIVO 123 sueros y 121 plasmas, de ellos 28 seronegativos al VHC y el resto positivos a ese virus. Se realizó un análisis de comparación de medias por ANOVA con un nivel de significación (α) de 0,05 y la prueba de Fisher.

Ensayo cuantitativo: Se evaluaron 22 muestras negativas pareadas de suero y plasma obtenido con CPDA-1 (ver Tabla 2.2), para verificar que no existían falsos positivos con ninguno de los dos tipos de muestra. Se realizó un análisis de comparación de Medias y de Varianzas y una prueba de hipótesis (Prueba exacta de Fisher, $p < 0,05$) según lo descrito en el acápite 2.4.

2.2.9.2. Especificidad Analítica o Reactividad cruzada

Para ambos ensayos se evaluaron 38 muestras positivas confirmadas a patógenos que pudieran presentar reacciones inespecíficas en el ensayo, como: VHA (7), VHB (7), VLTH I (2), VIH 1/2 (8), Dengue (5), *Trypanosoma cruzi* (5), Fiebre amarilla (cepa viral de referencia en cultivos celulares 17D) (1), Encefalitis de San Luis (cepa viral en cultivos celulares) (1) y Hepatitis Autoinmune (2). Todas resultaron negativas al UMELISA® HCV.

2.2.9.3. Sensibilidad, Especificidad y Exactitud Genotípica para ambos ensayos

Para estudiar la **Sensibilidad genotípica** del ensayo cualitativo se evaluó el panel *Pellicheck HCV-RNA* con ocho sueros de los genotipos 1 y 3. Para el ensayo cuantitativo se empleó el panel de genotipos del VHC, 02/202 del NIBSC, con seis genotipos del VHC a diferentes concentraciones: 1000 UI/mL (n= 3); 500 UI/mL (n= 3); 250 UI/mL (n= 3) y 125 UI/mL (n= 2), en tres ensayos y con analistas diferentes.

En el estudio de la **Especificidad y Exactitud genotípica** se analizó si el ensayo cuantitativo podía cuantificar debidamente los genotipos del VHC, se emplearon 35 muestras que contenían los genotipos 1, 2, 3 y 6 con concentraciones variables en todo el rango de la curva estándar del ensayo (1000 UI/mL a 220 000 UI/mL) (ver Tabla 2.2). Se realizaron cuatro ensayos y se evaluaron las muestras puras o diluidas: 1:10 o 1:100, para garantizar que estuvieran dentro del rango de cuantificación y pudieran ser cuantificadas con la mayor exactitud. Se comparó la cuantificación del ARN del VHC obtenida por nuestro ensayo cuantitativo y los resultados obtenidos con el estuche comercial *COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV test*. Se determinó por ambos métodos la concentración de cada muestra en UI/mL y se calculó su Log_{10} . Se consideró buena exactitud, cuando la diferencia obtenida era menor de $\pm 0,5 \log_{10}$ (Baylis *et al.*, 2005).

2.2.9.4. Sensibilidad Analítica o límite de detección al 95%

Ensayo cualitativo: EL límite de detección del 95 % (LD 95 %) se calculó por el método PROBIT (Finney, 1971), acápite 2.4. Para ello se evaluaron diluciones (1/1000, 1/2000, 1/4000 y 1/8000) de un ERS CP52 calibrado contra el IS 96/790, diluciones del IS (1/250, 1/500, 1/1000, 1/4000 y 1/8000) así como el panel de sensibilidad *Pellicheck HCV-RNA*, en días diferentes y por distintos operarios. En el momento de la evaluación se usaba el término de genomas equivalentes (geq/mL) para cuantificar el virus, la conversión actual es 1 UI/mL \approx 3,8 geq/mL (FDA Guidance for Industry, 2006).

Ensayo cuantitativo: Se diluyó seriadamente el ERS CP1107 con suero humano negativo al VHC hasta obtener concentraciones desde 62,5 UI/mL hasta 2000 UI/mL. Este experimento se realizó por tres analistas diferentes, en varios días de trabajo y con diferentes lotes de estuche. Para determinar el LD al 95 % y su intervalo de confianza (IC) se utilizó el análisis PROBIT (Finney, 1971), acápite 2.4.

2.2.9.5. Robustez

Para evaluar el efecto de pequeños cambios en la realización de la prueba cualitativa, se evaluaron en posiciones alternas 11 muestras de sueros seronegativas al VHC y 11 positivas (10 000 UI/mL de VHC) (ver Tabla 2.2), con diferentes lotes de reactivos, por diferentes operarios y en varios días para detectar si había contaminación cruzada. Igualmente se ensayaron ocho muestras positivas bajas (5000 UI/mL de VHC) (ver Tabla 2.2) en tres días diferentes, por varios analistas y con diferentes lotes del estuche, para un total de 24 determinaciones. Para el ensayo cuantitativo se ensayaron nueve sueros seronegativos al VHC intercalados con diluciones del IS 06/100 a las concentraciones 1000, 10 000 y 100 000 UI/mL, en tres días diferentes, por varios analistas y con diferentes lotes del estuche.

2.2.9.6. Comparación entre el UMELISA® HCV y UMELOSA® HCV CUALITATIVO

Con el UMELOSA® HCV CUALITATIVO se evaluaron muestras positivas por UMELISA HCV: 45 sueros de pacientes de una consulta de gastroenterología y 37 muestras procedentes de bancos de sangre (26 plasmas y 11 sueros) (ver Tabla 2.2). Se calculó el porcentaje de concordancia entre ambos métodos.

2.2.9.7. Exactitud frente al Estándar Internacional de ARN del VHC 96/798

Para determinar la exactitud se utilizó el IS 96/798, que se reconstituyó en 100 000 UI/mL y se diluyó 1:10 hasta 10 000 UI/mL y 1 000 UI/mL. Se realizaron tres réplicas de cada punto, por operarios diferentes. Para calcular la exactitud del ensayo se construyó una curva de RLP entre los Log_{10} Concentración observada vs. Log_{10} Concentración esperada, se determinó la pendiente (b), r y r^2 .

2.2.9.8. Rango lineal de la curva de cuantificación de ARN del VHC

Se determinó la linealidad de la curva con diluciones del IS 96/798 desde 100 000 UI/mL hasta 781,25 UI/mL en diferentes montajes y con diferentes operarios. A partir del ERS CP1107 a $2,67 \times 10^6$ UI/mL de ARN del VHC se realizaron diluciones seriadas 1/10, se hicieron seis réplicas de cada dilución en varios días y con analistas diferentes. Se calculó la ecuación de la RLP y el r^2 del gráfico de linealidad del ERS CP1107.

2.2.9.9. Precisión o reproducibilidad intraensayo e interensayo

Se realizaron tres diluciones (1/50, 1/250, 1/625) del ERS CP1107 y se hicieron 18 réplicas de cada dilución dentro del mismo ensayo para calcular la reproducibilidad intraensayo y entre diferentes lotes, por diferentes analistas y en días diferentes para la interensayo. Para cada muestra se calculó la media, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CVar).

2.2.9.10. Evaluación de cada ensayo frente a su homólogo comercial

Ensayo cualitativo: Por duplicado se evaluaron 65 muestras (ver Tabla 2.2) con este ensayo y con el estuche *AMPLICOR® Hepatitis C Virus (HCV) Test, v 2.0* y se calculó el porcentaje de concordancia entre ambos.

Ensayo cuantitativo: Se evaluaron 86 muestras (ver Tabla 2.2) por este ensayo y con el estuche comercial *AMPLICOR HCV MONITOR® Test v 2.0*. Para la comparación de ambos métodos se obtuvieron los parámetros de la recta de la correlación lineal (intercepto, pendiente, coeficiente de correlación (r) y coeficiente de determinación (r²). También se obtuvo la media de las diferencias de log₁₀ entre los valores esperados y obtenidos de las concentraciones de las muestras, el cual debe ser inferior a 0,5 log₁₀ (*FDA Guidance for Industry*, 2011).

2.3. Aspectos éticos de la investigación

En los diferentes estudios descritos, primero se brindó la información y luego se recogió el consentimiento informado verbal de los participantes voluntarios. Fue una premisa esencial, comunicarles que se les informaría de los resultados obtenidos.

2.4. Procesamiento estadístico de los resultados

En los experimentos de comparación de muestras de suero y plasma se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple (Sigarra, 1985) y su ordenamiento se realizó con una prueba de Tukey-Kramell. Previamente, los datos se analizaron mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov (para comprobar su ajuste a una distribución normal y una prueba de Bartlett para determinar homogeneidad de varianza). Se utilizó la Prueba exacta de Fisher para la comparación entre dos grupos mediante una prueba de hipótesis, donde la hipótesis nula comprende la igualdad de Medias y Varianzas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas para $p < 0,05$. Se utilizó el Paquete estadístico *STATISTICA v6.0, 2001* (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, EE.UU).

En el experimento de determinación de la concentración óptima de los cebadores, se compararon las medias empleando la prueba paramétrica T de Student. Se utilizó un nivel de significación (α) de 0,05.

Para comparar parejas de muestras o ensayos se realizó una regresión lineal y se calcularon los parámetros de la curva: intercepto, pendiente (b), el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2).

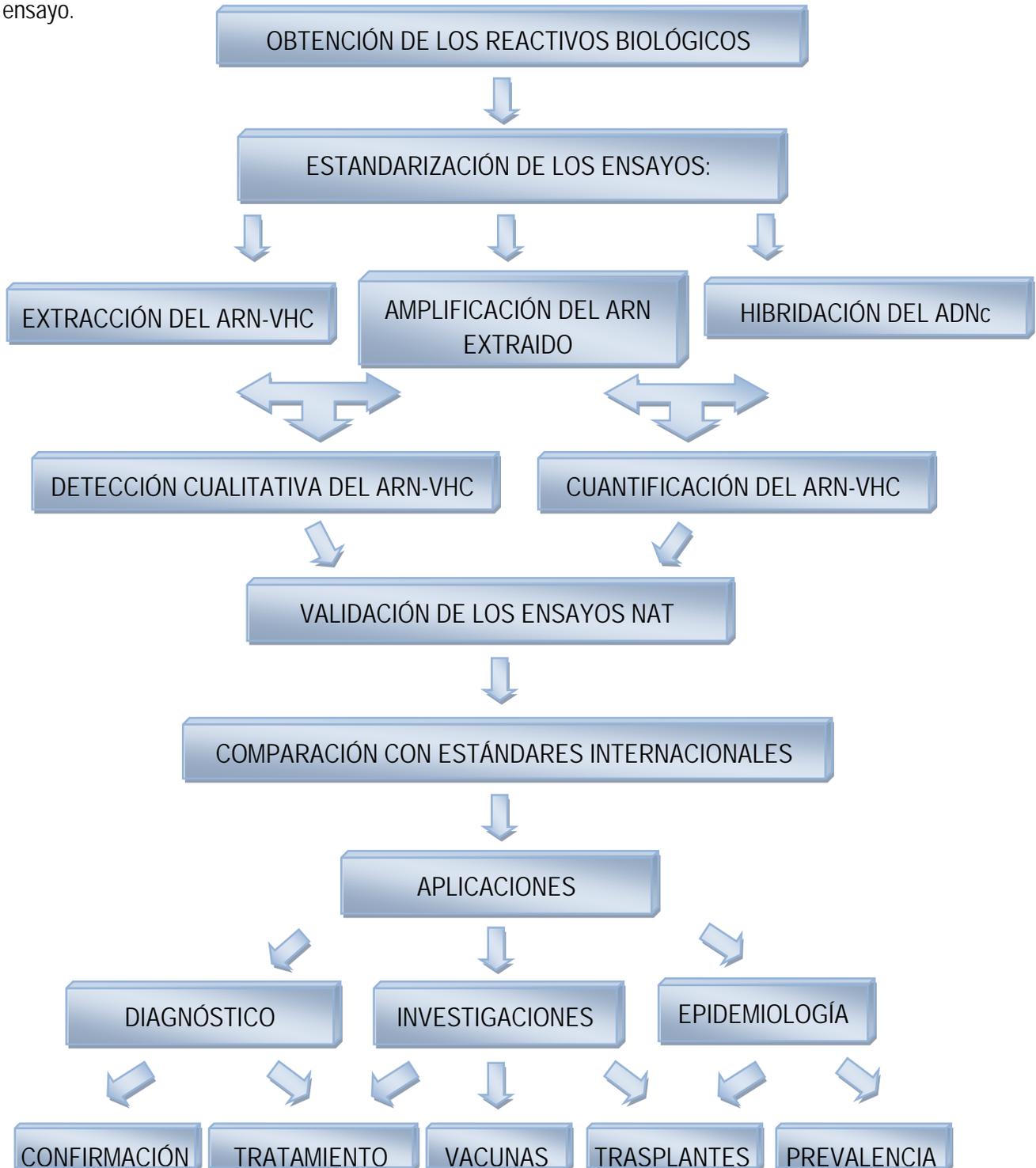
Para calcular el LD 95 % y su intervalo de confianza (IC) para ambos ensayos, se utilizó el programa estadístico *MINITAB® Release 14.12.0 (Minitab Inc., State College, Pensilvania, EE.UU.)* y su análisis matemático de probabilidades *PROBIT*: este consiste en una Regresión Logística Binaria que relaciona una variable con respuesta binaria ante un estímulo externo (Finney, 1971).

2.5. Análisis económico de la factibilidad de producción de ambos estuches

En el análisis de la eficiencia económica uno de sus elementos es el análisis del costo de producción. El mismo se define como la expresión en forma monetaria de los gastos de una organización para producir. Lo económico que resulta del trabajo de una organización está dado por el costo de producción, el cual muestra la cuantía de los insumos utilizados en la producción de bienes y servicios y el costo total se calcula según la ecuación de Goldratt, 1990: $CT = GEC + GM + GS + ASS + GA + OG$; donde: CT= Costo de producción total; GEC=Gasto de energía y combustible; GM= Gasto de materia prima y materiales; GS= Gasto en salario; ASS= Aporte a la seguridad social; GA= Gasto de amortización; OG= Otros gastos. Se analizó la factibilidad de la producción por el CIE de ambos ensayos de acuerdo al costo de producción de cada determinación y mediante la comparación con los precios de las determinaciones de los estuches comerciales, con el objetivo de producir los estuches de forma estable y satisfacer las demandas del sistema cubano de salud.

2.6. Diagrama de flujo

Para una mejor comprensión, se muestra un diagrama de flujo que resume la estrategia seguida en cada ensayo.



CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1. Estandarización de un ensayo molecular para la detección del ARN del VHC

Se desarrolló un ensayo cualitativo *in vitro* para el diagnóstico molecular del ARN del VHC en suero o plasma humano basado en las tecnologías NAT y SUMA. Para ello, se partió de estandarizar las condiciones del aislamiento del ARN a partir de suero y plasma, el cual es un paso crítico para la detección del genoma viral. Posteriormente se estandarizaron la amplificación y la detección. En cada etapa se ajustaron las condiciones experimentales tales como: concentración de reactivos y muestras, tiempos y volúmenes de reacción.

3.1.1. Determinación de las condiciones óptimas de extracción del ARN del VHC

Se aisló el ARN del VHC a partir de tres CN y del ERS CP52 a 50, 100, 500, 1 000 y 5 000 UI/mL mediante los dos métodos de extracción (MER y MEO), descritos en el acápite 2.2.5. Luego se realizó RT-PCR y PCR2 mediante el MAO descrito en el acápite 2.2.6.1. Los productos de la amplificación se observan en la figura 3.1, donde: desde los carriles del 2 al 7 se aplicaron las muestras extraídas por el MER donde la solución desnaturante no contiene ARN heterólogo (ARNh) y de los carriles 9 al 14 las muestras extraídas por el MEO, donde el TL contiene ARNh.

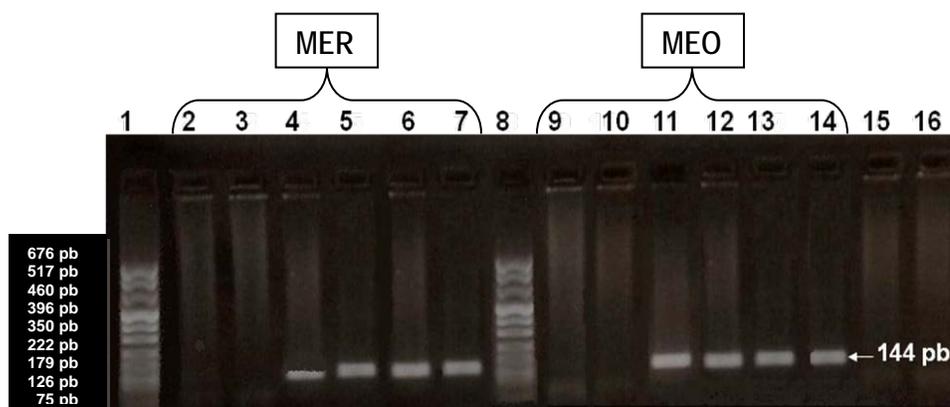


Figura 3.1. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos obtenidos por el MAO a partir del CN y de diferentes concentraciones del ERS CP52 con la utilización de dos métodos de extracción de ARN: **MER** (sin ARNh): CN, carril 2; ERS CP52: carril 3, 50 UI/mL; carril 4, 100 UI/mL; carril 5, 500 UI/mL; carril 6, 1 000 UI/mL; carril 7, 5 000 UI/mL. **MEO** (TL con ARNh): CN: carril 9, ERS CP52: carril 10, 50 UI/mL; carril 11, 100 UI/mL; carril 12, 500 UI/mL; carril 13, 1 000 UI/mL; carril 14, 5 000 UI/mL; carriles 15 y 16: CN (TL con ARNh); carriles 1 y 8: marcador de ADN pGEM (1000 ng de cada fragmento de ADN).

En los carriles 4 al 7 y 11 al 14 se observa una sola banda intensa a la altura de 144 pb, tamaño esperado para el producto amplificado por RT-PCR y PCR2 a partir de todas las concentraciones del ERS CP52 ensayadas, excepto a 50 UI/mL (carriles 3 y 10), tampoco se observó en el CN (carriles 2, 9, 15 y 16).

En el nuevo procedimiento de extracción, MEO, con un TL reformulado donde se incorpora ARNh, se logran precipitados más visibles y bandas más intensas en las muestras positivas (Figura 3.1, carriles 11 al 14), aun a bajos niveles de ARN viral (100 UI/mL, carril 11) si se compara con la banda observada cuando se utiliza el MER (carril 4). Además, la introducción del ARNh no afecta su especificidad dado que los CN no muestran bandas inespecíficas (carriles 9, 15, 16), lo que indica que el ARNh no es amplificado por los cebadores utilizados y, por ende, no se detecta. La reformulación del TL, en cuanto a concentraciones de sus componentes y el uso de un ARNh como agente coprecipitante, también favorece la estabilidad de los ARN, según estudios de estabilidad realizados con estándares almacenados en TL a 4 °C hasta 12 meses (ANEXO 3), estos resultados están recogidos en la Patente 23588 otorgada por la OCPI en el 2010. (ANEXO 10).

3.1.2. Determinación de las condiciones óptimas de amplificación del ARN extraído

En la figura 3.2 se muestran los resultados de la amplificación realizada por MAR y MAO al ARN purificado por el MEO a partir del CN y las diferentes concentraciones del ERS CP52. La diferencia de temperaturas observadas en el paso uno de las RT-PCR es debido a que son las recomendadas por los productores de las enzimas reverso transcriptasas utilizadas. Se observa la presencia de la banda de 144 pb en los carriles correspondientes al ERS CP52 y su ausencia en el CN. Esto indica que el cebador diseñado en este trabajo (VHC 12n) es capaz de detectar el ARN viral al igual que el cebador comercial (HCV01V/II).

Además, esta optimización del MAO conllevó a la evaluación de la concentración de cloruro de magnesio ($MgCl_2$) cuando se utilizan menores cantidades de las enzimas AMV de la RT y la *Taq* Polimerasa (resultados no mostrados). Con estos estudios del procedimiento MAR se estableció que, con una concentración de 2,5 mmol/L en lugar de 1,5 mmol/ de $MgCl_2$, se obtienen bandas mejor definidas, aun cuando la concentración final de ambas enzimas disminuye considerablemente, siendo 5 y 71 veces menor en la etapa de la RT-PCR para la AMV y la *Taq* Pol, respectivamente, sin que se afecte la calidad de la determinación.

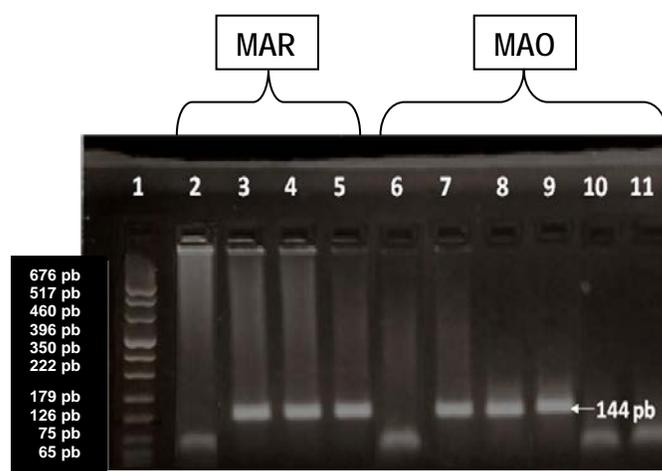


Figura 3.2. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de los productos obtenidos por MAR y MAO a partir del ARN aislado por el MEO del CN y de diferentes concentraciones del ERS CP52. **MAR:** CN, carril 2; ERS CP52: carril 3, 100 UI/mL; carril 4, 500 UI/mL; carril 5, 5 000 UI/mL. **MAO:** CN, carril 6; ERS CP52: carril 7, 100 UI/mL; carril 8, 500 UI/mL; carril 9, 5 000 UI/mL; carriles 10 y 11: CN; carril 1: marcador de ADN pGEM (1000 ng de cada fragmento de ADN).

En el MAO se introdujo un inhibidor de RNasas con el objetivo de disminuir los falsos negativos debido al efecto de las RNasas exógenas que pueden afectar el ensayo durante su ejecución.

Si se comparan los volúmenes de mezclas de RT-PCR y PCR2 en ambos métodos (Tabla 2.3), se puede apreciar su disminución de 100 a 30 μ L (un tercio) en el MAO, lo cual significa un ahorro de reactivos sin que disminuya la calidad del producto amplificado.

3.1.2.1. Diseño del cebador VHC 12n y evaluación de la sensibilidad para los genotipos 1 y 3

3.1.2.1.1. Evaluación de los cebadores comerciales para la RT-PCR del VHC

Los resultados obtenidos al evaluar los cebadores comerciales HCV01V/I y HCV01V/II para la RT-PCR del VHC, con el panel de sensibilidad *Pelichack HCV-RNA* para los genotipos 1 y 3, así como para el control de corrida RC (genotipo 3), se muestran en las Tablas 3.1 y 3.2, respectivamente. Se puede apreciar que para el genotipo 3 la sensibilidad es 100 veces menor que para el genotipo 1, lo cual ocurre también al evaluar el RC.

Tabla 3.1. Evaluación del panel Pelicheck HCV-RNA con los cebadores comerciales

Genotipo 1			Genotipo 3		
(geq/ml)	HCV01V/I - HCV01V-II		(geq/ml)	HCV01V/I - HCV01V-II	
	n	% +		n	% +
36 000	2	100	60 000	1	100
3 600	4	100	6 000	4	0
900	4	100	600	4	0
225	4	50	150	---	---
56	1	0	37,5	---	---
16	1	0	9,37	---	---
4	1	0	2,34	---	---
1	1	0	0,59	---	---

Leyenda: geq/mL: genomas equivalentes/mL; 1 UI/mL \approx 3,8 geq/mL (FDA Guidance for Industry, 2006)

Tabla 3.2. Evaluación del RC con los cebadores comerciales

Genotipo 3			
Diluciones del RC	UI/mL	HCV01V-II	
		n	% +
1/1	710	2	0
1/10	71	3	33
1/100	7,1	4	0

Leyenda: n: número de réplicas; % +: porcentaje de positivos

Dados estos resultados y que la sensibilidad de la amplificación depende de que el cebador de la RT esté ubicado en la región más conservada para todos los genotipos, para obtener un ADNc representativo, se decidió realizar un alineamiento de secuencias de todos los genotipos del VHC y verificar la secuencia del cebador HCV01V/II.

3.1.2.1.2. Diseño del nuevo cebador VHC 12n y comparación con el HCV01V-II

La búsqueda de secuencias nucleotídicas de diferentes genotipos y subtipos del VHC en las base de datos permitió obtener 34 secuencias diferentes de los genotipos del 1 al 11 (Bukh *et al.*, 1995; Tokita *et al.*, 1996) nomenclatura utilizada en el momento de realizar la búsqueda en el año 1999 (Tabla 3.3).

Al realizar el alineamiento múltiple de secuencias en la región 5' NC (nt 250 al 289) del VHC (Figura 3.3) se observó que en el fragmento seleccionado, cinco de las siete secuencias del genotipo 3, presentan un triplete tca en sustitución del triplete CTG, que está en la posición 251-253 del extremo 5' de la zona complementaria

a la secuencia del cebador comercial HCV01V-II, lo cual pudiera ser la causa de su baja eficiencia para amplificar al genotipo 3.

Tabla 3.3. Descripción de las secuencias alineadas

Secuencias en el alineamiento		Número de accesos del EMBL		Genotipos	
1a-HPCHCJ1	3g-HCV3G	D10749	X91421	1a	3g
1b-HPCJCG	4a-HCV4APOLY	D90208	Y11604	1b	4a
1c-HPCP1	4f-HPCCOPRO	D14853	L38333	1c	4f
1e-HPCCOPRAE	5a-HCV1480	L38349	Y13184	1e	5a
1f-HPCCOPRAF	6a-HPCCOPRU	L38350	L38339	1f	6a
2a-AF169005	6b-HPCCORE04	AF169005	D37841	2a	6b
2b-HP CJ8G	7a-HPCE2NS160	D10988, D01221	D31971, D30796	2b	7a
2c-HCD409	7b-D88467	D50409	D88467, D17498	2c	7b
2e-HP CJK020A1	7c-HPCCOPRW	D49745	L38341	2e	7c
2f-HP CJK081B1	7d-HPCCORE06	D49754	D37843	2f	7d
2k-AB031663	8a-D88470	AB031663	D88470, D17501	2k	8a
3a-HPCHK6	8b-D88468	D28917	D88468, D17499	3a	8b
3b-HPCHCVTR1	9a-D84265	D49374, D26556	D84265	3b	9a
3c-HP CNE048A	9b-HPCCORE12	D16612	D37849	3c	9b
3d-HP CNE274I	9c-HPCCORE11	D16620	D37848	3d	9c
3e-HP CNE145G	10a-HCJ K049E1	D16618	D63821	3e	10a
3f-HP CNE125C	11a-HCJ K046E2	D16614	D63822	3f	11a

		5' -250			3' -289
1a-HPCHCJ1	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
1b-HPCJCG	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
1c-HPCP1	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
1e-HPCCOPRAE	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
1f-HPCCOPRAF	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
2a-AF169005	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
2b-HP CJ8G	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
2c-HCD409	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
2e-HP CJK020A1	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
2f-HP CJK081B1	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
2k-AB031663	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
3a-HPCHK6	5' UTR	<i>Atca</i> CTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
3b-HPCHCVTR1	5' UTR	<i>Atca</i> CTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
3c-HP CNE048A	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
3d-HP CNE274I	5' UTR	<i>Atca</i> CTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
3e-HP CNE145G	5' UTR	<i>Atca</i> CTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
3f-HP CNE125C	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
3g-HCV3G	5' UTR	<i>Atca</i> CTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
4a-HCV4APOLY	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
4f-HPCCOPRO	5' UTR	ACC GCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
5a-HCV1480	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
6a-HPCCOPRU	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
6b-HPCCORE04	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGCGTT	GGGTTGCGAA	AGGCCTTGTG
7a-HPCE2NS160	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
7b-D88467	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
7c-HPCCOPRW	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
7d-HPCCORE06	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
8a-D88470	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
8b-D88468	5' UTR	<i>At</i> tGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
9a-D84265	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
9b-HPCCORE12	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
9c-HPCCORE11	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
10a-HCJ K049E1	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG
11a-HCJ K046E2	5' UTR	ACTGCTAGCC	GAGTAGTGTT	GGGTCGCGAA	AGGCCTTGTG

Figura 3.3. Fragmento de un alineamiento múltiple (nt 250-289 de la región 5'NC) que contiene 34 secuencias de genotipos del VHC del 1 al 11 (Bukh et al., 1995). El fragmento de secuencia complementaria al cebador HCV01V-II aparece resaltado en letra mayúscula y negrita. En letra minúscula y negrita están marcados los dos nt sustituidos en los genotipos 4f y 8b y la secuencia cambiada para diferentes subtipos del genotipo 3. Las letras itálicas, negritas y mayúsculas indican la secuencia complementaria al cebador nuevo VHC 12n. Alineamiento realizado con el CLUSTAL W (University College Dublin, Irlanda).

El diseño del cebador VHC 12n corrige estos problemas (Figura 3.3, letras mayúsculas itálicas y en negrita). Como se puede observar, esta secuencia es altamente conservada en todas las secuencias representadas en el alineamiento, presenta un solo error en el nt 266, una C en lugar de una T, en algunas secuencias de los genotipos 2, 4 y 6, lo cual no debe afectar la detección de los mismos pues se encuentra en la región interna de la secuencia (Chenna *et al.*, 2003).

Después de seleccionada la posible secuencia del nuevo cebador, se evaluó por el programa OLIGO v 5.0 (Molecular Biology Insights Inc., Cascade, EE.UU.) y se observó que no formaba dímeros con su pareja de cebador (HCV01V-I), ni lazos, ni horquillas con la secuencia (resultados no mostrados), parámetros muy importantes que debe cumplir un cebador para ser utilizado en un ensayo (Rose *et al.*, 2003).

3.1.2.1.3. Evaluación de la sensibilidad para los genotipos 1 y 3

Los resultados obtenidos al evaluar el Panel de sensibilidad *Pelicheck HCV-RNA* para los genotipos 1 y 3, así como para el RC se muestran en las Tablas 3.4 y 3.5 respectivamente. Se puede apreciar que para el genotipo 3 se incrementa en 100 veces la sensibilidad del ensayo cuando hay 600 geq/mL (157 UI/mL), sin producirse afectación para el genotipo 1. Un resultado similar se observa al evaluar el RC con el cebador VHC 12n (Tabla 3.5).

Tabla 3.4. Evaluación del panel *Pelicheck HCV-RNA* con HCV01V-II y VHC 12n

Genotipo 1					Genotipo 3				
(geq/ml)	HCV01V-II		VHC 12n		(geq/ml)	HCV01V-II		VHC 12n	
	n	% +	n	% +		n	% +	n	% +
36 000	2	100	2	100	60 000	1	100	3	100
3 600	4	100	2	100	6 000	4	0	2	100
900	4	100	3	100	600	4	0	3	100
225	4	50	3	67	150	---	---	2	0
56	1	0	3	0	37,5	---	---	1	0
16	1	0	2	0	9,37	---	---	2	50
4	1	0	2	0	2,34	---	---	2	0
1	1	0	2	0	0,59	---	---	2	0

geq/mL: genomas equivalentes/mL, 1 UI/mL \approx 3,8 geq/mL (FDA Guidance for Industry, 2006)

Tabla 3.5. Evaluación del RC con HCV01V-II y VHC 12n

Genotipo 3					
Diluciones del RC	UI/mL	HCV01V-II		VHC 12n	
		n	% +	n	% +
1/1	710	2	0	4	100
1/10	71	3	33	4	75
1/100	7,1	4	0	4	75

Legenda: n: número de réplicas; % +: porcentaje de positivos

3.1.3. Método de detección cualitativa (MDC) mediante la tecnología SUMA

El desarrollo de un ensayo de detección mediante hibridación *in situ* y tecnología SUMA precisa de: 1) sondas de captura que presenten buena complementariedad de bases con el producto amplificado; 2) un sistema de amplificación de la señal como Biotina/ Estreptavidina, dos biomoléculas con muy alta afinidad entre ellas (Välímää *et al.*, 2008) y 3) un sistema de revelado enzimático compuesto por la enzima fosfatasa alcalina y su sustrato fluorescente, 4-metil-umbelliferil fosfato.

3.1.3.1. Selección de la sonda de captura para el recubrimiento de las placas

Al evaluar las sondas de captura Q3, Q4, Q3-NH₂ y Q4-NH₂ a 2,5 ng/μL con los diluentes glutaraldehído al 0,025 % y carbonato de sodio 0,1 mol/L a pH 9, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 3.4. Los valores de fluorescencia más elevados se alcanzan para los cuatro tipos de sondas con el carbonato de sodio 0,1 mol/L a pH 9, y fundamentalmente para las sondas Q3 y Q3-NH₂.

No obstante, después se estudió la estabilidad de las sondas unidas a las umplacas con ambos diluentes dado que las uniones covalentes favorecidas con el glutaraldehído podrían influir en la estabilidad a largo plazo. Los resultados demostraron una buena estabilidad para ambos diluentes en un período de hasta 24 meses a 4 °C pero siempre se obtuvo una señal más alta con el diluyente carbonato de sodio que con el glutaraldehído (resultados no mostrados).

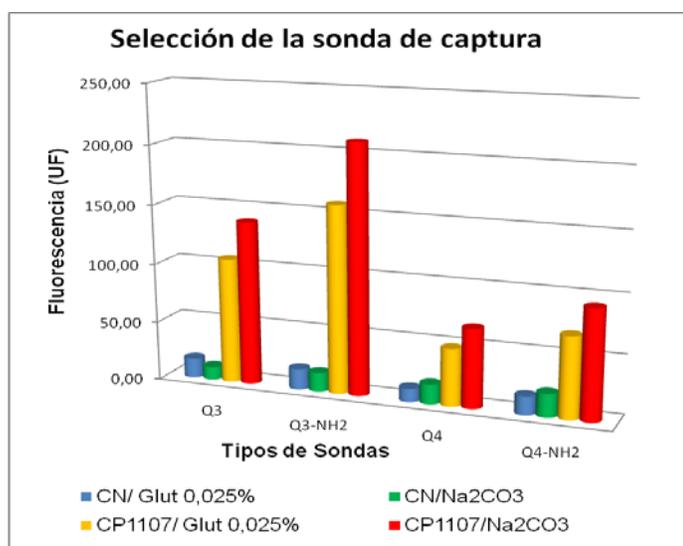


Figura 3.4. Selección de la sonda de captura para el recubrimiento de las umplacas. Se diluyeron las sondas Q3, Q4, Q3-NH₂ y Q4-NH₂ a 2,5 ng/μL, en glutaraldehído (Glut) al 0,025 % y Na₂CO₃ 0,1 mol/L a pH 9,0. Se recubrieron las umplacas con 30 μL por pozo de cada mezcla. Después de cuatro horas de incubación a 20-25 °C en cámara húmeda, se realizó un lavado de las placas con Tween-20 al 0,05 % y un bloqueo con glicina 0,2 mol/L durante dos horas a 20-25 °C en cámara húmeda. Finalmente, se secaron las placas por dos horas a 37 °C. Para la selección de la sonda y de las condiciones de recubrimiento se evaluaron cuatro réplicas del ERS CP1107 a 500 UI/mL y del CN, a las que se les aisló el ARN según el MEO, posteriormente el ARN se amplificó por el MAO. Los productos amplificados se detectaron según lo descrito en el acápite 2.2.7 y los resultados se interpretaron según el acápite 2.2.7.4.

3.1.3.2. Selección de la concentración óptima de la sonda de captura

En la figura 3.5 se muestra la curva de Unidades de fluorescencia (UF) vs Concentración de la sonda Q3-NH₂ para el ERS CP1107 (500 UI/mL) y tres CN. A partir de 1,75 ng/μL de sonda se alcanza un máximo de señal de fluorescencia (meseta) lo cual indica que, a partir de esa concentración, la sonda es suficiente para detectar el producto amplificado sin alterarse el valor de la señal de los controles negativos (diez veces menor), por ello seleccionamos a 2,0 ng/μL como la concentración de sonda óptima para el recubrimiento. Este valor está dentro del intervalo recomendado para los ensayos de hibridación *in situ*: 0,5 a 10 ng/μL (Tijssen, 1993). Concluimos que para la hibridación del ensayo cualitativo se utilizarán 2 ng/μL de la sonda de captura Q3-NH₂ diluida en carbonato de sodio a 0,1 mol/L a pH 9.

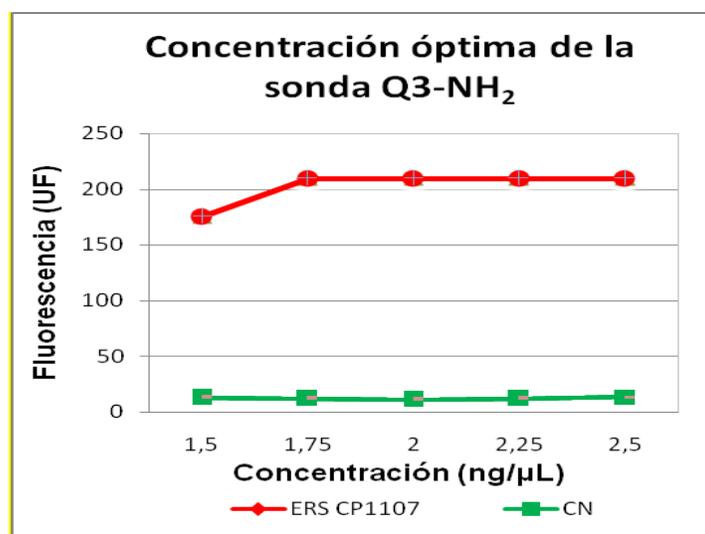


Figura 3.5. Curva para determinar la concentración óptima de la sonda de captura Q3-NH₂. Se evaluó la sonda de captura Q3-NH₂ a las concentraciones de recubrimiento: 1,5; 1,75; 2,0; 2,25 y 2,5 ng/μL, diluida en Na₂CO₃ 0,1 mol/L a pH 9. Se recubrieron las umplacas con cada una de las tres concentraciones a 30 μL por pozo. Después se continuó el proceso como se describe en el acápite 2.2.7.1. Para la selección de la mejor concentración de recubrimiento se evaluaron cuatro réplicas del ERS CP1107 a 500 UI/mL y del CN, a los cuales se les realizó el MEO y su posterior amplificación por el MAO. La detección se realizó según el acápite 2.2.7 y los resultados se interpretaron según el acápite 2.2.7.4

3.2. Evaluación del ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO

El sistema se evaluó según las Guías nacionales e internacionales de validación para ensayos NAT (ECCLS, 1999; OMS, 2003; Quintana y Apezteguía, 2010; *FDA guidance for industry*, 2011).

3.2.1. Especificidad clínica

La especificidad clínica del ensayo se evaluó con 118 muestras seronegativas al UMELOSA HCV: 50 sueros y 68 plasmas. Todos los sueros fueron negativos al UMELOSA HCV CUALITATIVO, con excepción de tres plasmas que resultaron inicialmente positivos, se ensayaron nuevamente y uno de ellos fue negativo (falso positivo del ensayo por contaminación cruzada) y los otros dos volvieron a dar positivos. Estos últimos se evaluaron también por el ensayo comercial *AMPLICOR® Hepatitis C Virus (HCV) Test, v 2.0* y se demostró que eran verdaderos positivos. Al encuestar a ambas personas, existían antecedentes epidemiológicos de posible infección (uno recibía inyecciones frecuentes por asma y el otro se había operado de apendicitis hacía mes y medio), por lo que se puede afirmar que se encontraban en período de seroconversión, por lo que no fueron detectados como positivos por el ensayo de anticuerpos.

El falso positivo obtenido no estuvo relacionado con problemas de especificidad de la técnica, sino con la posibilidad real de contaminación, conocida y descrita para este tipo de ensayos si no se tienen todos los cuidados en la realización del mismo (Aslanzadeh, 2004). Si consideramos la posibilidad de su ocurrencia y lo incluimos en el cálculo de especificidad, se obtiene un valor de Especificidad clínica de 99,15 % (n = 118).

3.2.2. Validación del tipo de muestra indicado para la prueba

Al evaluar 244 muestras (121 plasmas y 123 sueros), de ellas, 28 eran sueros negativos, 28 eran plasmas negativos y el resto resultaron positivas. Para la comparación entre las medias de sueros y plasmas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un nivel de significación (α) de 0,05. Se evidencia que no existen diferencias significativas entre sueros y plasmas negativos ($p= 0,1818$), ni entre los sueros y plasmas positivos ($p=0,2753$) (Prueba exacta de Fisher, $p< 0,05$) (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Comparación entre muestras de suero y plasma, positivas y negativas

Muestras	Suero (UF \pm DE)	Plasma (UF \pm DE)	P (ANOVA)
Positivas	209,72 \pm 0,65	209,63 \pm 0,92	0,2753
Negativas	16,12 \pm 6,16	13,56 \pm 5,04	0,1818

Leyenda: UF, unidades de fluorescencia; DE, desviación estándar de la media; P, probabilidad; ANOVA, análisis de varianza.

Es importante señalar que en una prueba realizada con sueros y plasmas pareados (estos últimos anticoagulados con heparina) se obtuvieron resultados discordantes (resultados no mostrados), se produjeron falsos negativos debido a que la heparina inhibe la acción de la *Taq* polimerasa durante la PCR (Holodniy *et al.*, 1991; Kleiboeker, 2003), por tanto, para este ensayo el plasma debe obtenerse con EDTA o CPDA-1.

3.2.3. Sensibilidad analítica

Para evaluar la sensibilidad analítica se ensayaron por el UMELOSA® HCV CUALITATIVO el ERS CP52, el panel *Pellicheck* y el IS. Los resultados aparecen reflejados en las Tablas 3.7, 3.8 y 3.9 respectivamente.

Tabla 3.7. Evaluación de la sensibilidad analítica del UMELOSA® HCV CUALITATIVO con el ERS CP52

Dilución del CP52	UI/mL	No. de réplicas	No. de positivos	% de positivos
1: 1 000	250	31	31	100
1: 2 000	125	40	39	97,5
1: 4 000	62,5	19	15	79
1: 8 000	31,25	15	5	33

Análisis de PROBIT (Finney, 1971)

Tabla 3.8. Evaluación de la sensibilidad analítica del UMELOSA® HCV CUALITATIVO con el panel Pellicheck

No.	Genotipo 1			No.	Genotipo 3		
	(geq/ml)	n	% +		(geq/ml)	n	% +
1	36 000	2	100	9	60 000	3	100
2	3 600	2	100	10	6 000	2	100
3	900	3	100	11	600	3	100
4	225	3	67	12	150	2	0
5	56	3	0	13	37,5	1	0
6	16	2	0	14	9,37	2	50
7	4	2	0	15	2,34	2	0
8	1	2	0	16	0,59	2	0

Leyenda: % +: porcentaje de positividad; n: número de réplicas ensayadas; geq/mL: genomas equivalentes/mL (1 UI/mL \approx 3,8 geq/mL) (FDA Guidance for Industry, 2006).

Tabla 3.9. Evaluación de la sensibilidad analítica del UMELOSA® HCV CUALITATIVO con el IS 96/790

Dilución del IS 96/790	UI/mL	No. réplicas	Nº de positivos	% de positivos
1: 250	400	13	13	100
1: 500	200	13	12	92
1: 1 000	100	24	21	88
1: 4 000	25	13	4	31
1: 8 000	12,5	9	3	33

El LD 95 % del ensayo calculado por el método de PROBIT (acápite 2.4, Finney, 1971), a partir de los resultados obtenidos para el ERS CP52 (Tabla 3.7), resultó ser igual a 101,7 UI/mL con un intervalo de confianza de 81,0 a 162,8 UI/mL.

3.2.4. Especificidad Analítica o Reactividad cruzada

Las 38 muestras negativas a anti-VHC y positivas confirmadas a diferentes patologías se evaluaron en el UMELOSA® HCV CUALITATIVO y todas resultaron negativas por este ensayo, lo cual evidencia que no existe reactividad cruzada con ninguna de estas entidades, con una Especificidad Analítica del 100 %. Ver ANEXO 4.

3.2.5. Robustez

Resultaron positivas a la prueba todas las muestras positivas con baja carga viral que se ensayaron. No hubo afectaciones por pequeñas variaciones en las condiciones de ejecución, es decir, no hubo falsos negativos.

Ver ANEXO 5A. No hubo contaminación cruzada entre las muestras positivas con alta carga viral y aquellas negativas analizadas. Todas las muestras negativas y el control negativo del ensayo fueron negativos a la prueba, mientras que las muestras positivas y el control positivo resultaron positivos. Ver ANEXO 5B.

3.2.6. Concordancia entre el UMELISA HCV y el UMELOSA® HCV CUALITATIVO

La Tabla 3.10 muestra los resultados del estudio clínico que incluyó muestras positivas por el UMELISA HCV procedentes de diferentes instituciones y su concordancia con el UMELOSA® HCV CUALITATIVO.

Tabla 3.10. Comparación del UMELISA HCV y el UMELOSA® HCV CUALITATIVO

Muestras (procedencia)	Total	Sueros/ Plasmas	+Ac	+PCR	Concordancia (%)	
IGE	45	45 / -	45	30	67	
Banco de sangre Marianao	37	11 / 26	37	7 / 14	64 / 54	Total: 57

Leyenda: IGE: Instituto de Gastroenterología, +Ac: número de muestras que resultaron positivas al UMELISA HCV +PCR: número de muestras que resultaron positivas al UMELOSA HCV CUALITATIVO

El análisis hecho para banco de sangre permitió conocer el porcentaje de positividad detectado por ambos ensayos y la concordancia entre ellos, donde el 57 % de las muestras con presencia de anticuerpos al VHC resultaron positivas por UMELOSA® HCV CUALITATIVO. En comparación, en las muestras provenientes de consultas especializadas, se obtuvo un porcentaje de concordancia mayor (67 %) entre ambos ensayos.

3.2.7. Comparación del UMELOSA® HCV CUALITATIVO vs AMPLICOR® HCV Test, v 2.0

Las 12 muestras negativas por UMELISA HCV también lo fueron por UMELOSA® HCV CUALITATIVO y AMPLICOR® HCV Test, v 2.0. De las 53 muestras seropositivas al VHC, 13 fueron negativas en la evaluación con ambos estuches de detección de ARN viral y las 40 restantes, positivas por ambas pruebas. Se obtuvo una completa concordancia (100 %), entre los resultados obtenidos con el estuche comercial AMPLICOR® HCV Test, v 2.0 y el UMELOSA® HCV CUALITATIVO para todas las muestras evaluadas.

3.3. Estandarización de un ensayo para la cuantificación del ARN del VHC

Se desarrolló un ensayo cuantitativo *in vitro* para determinar la cantidad de ARN del VHC en suero y plasma humano, basado en la tecnología NAT y en una RT-PCR competitiva e hibridación cuantitativa en el SUMA, por lo que se optimizaron sus tres etapas: extracción del ARN, amplificación y detección.

3.3.1. Determinación de las condiciones de extracción

La extracción se realiza según el MEO, con la variante de que al TL se le agregó el EI a la concentración de competencia de 1,8 pg/μL (acápite 3.3.3.2), pues el EI compite con el ARN del VHC del estándar de cuantificación y de las muestras durante la RT y la PCR, lo cual permite la cuantificación de las muestras.

3.3.2. Determinación de las condiciones óptimas de amplificación

3.3.2.1. Selección de la concentración óptima de los cebadores Q1 y Q2

En la RT-PCR competitiva se evaluaron dos concentraciones de los cebadores Q1 y Q2 en la mezcla de reacción: 0,5 y 1 μmol/L a una temperatura de hibridación de 67 °C (T_m determinada mediante el programa OLIGO v.5.0 (*Molecular Biology Insights Inc. Cascade, EE.UU.*)). Los resultados se muestran en la Tabla 3.11. La fluorescencia media correspondiente al ERS CP1107 fue significativamente superior cuando los cebadores se emplearon a 1 μmol/L cada uno, con respecto a cuando se utilizaron a 0,5 μmol/L (p=0,0003) (Prueba paramétrica T de Student con α= 0,05), mientras que para los CN, las señales obtenidas fueron similares y no significativas (p=0,2136) a las dos concentraciones de cebadores evaluadas (Tabla 3.11). Por lo tanto, se seleccionó 1 μmol/L como la concentración final de los cebadores Q1 y Q2 en la mezcla de RT-PCR.

Tabla 3.11. Valores medios de fluorescencia (cuatro réplicas) correspondientes al CN y al ERS CP1107 en el ensayo de RT-PCR con el empleo de los cebadores Q1 y Q2 a 0,5 y 1 μmol/L cada uno

Muestra	Valor medio de fluorescencia (UF) ± DE		P (T Student)	Diferencia (IC 95%)
	Q1 y Q2 (0,5 μmol/L)	Q1 y Q2 (1,0 μmol/L)		
ERS CP1107 (5 000 UI/mL)	113,6 ± 6,45	162,5 ± 7,05	0,0003	49,0 (38,63; 59,37)
CN	12,83 ± 0,94	12,01 ± 0,7	0,2136	0,82 (0,57; 1,07)

Legenda: UF, unidades de fluorescencia; DE: Desviación estándar de la media; P, probabilidad; Dif, diferencia; IC, intervalo de confianza.

3.3.3. Preparación de los transcritos de VHC y EI

3.3.3.1. Síntesis de los ARN sintéticos de VHC y EI por el método de transcripción *in vitro*

Para la obtención de los transcritos VHC y EI se realizó el clonaje de los fragmentos de ADN del VHC y EI en el vector T y, cuando se obtuvieron los plásmidos *pGEM-T* con las bandas de interés en la orientación deseada, verificadas por secuenciación nucleotídica automática, se sintetizaron los transcritos del VHC (TVHC-0309) y del EI (TEI-0309) (resultados no mostrados). La concentración de ARN obtenida para TVHC-0309 fue de 914,5 μg/μL (equivalente a 1,42x10¹⁴ UI/mL de ARN del VHC, evaluado frente al IS 06/100 de la OMS) y para TEI-0309 de 72 μg/μL.

3.3.3.2. Determinación de la concentración óptima de competencia del EI

Como se observa en la tabla 3.12, la dilución óptima del TEI-0309 como estándar interno de cuantificación es de $1:4 \times 10^7$, con la que se obtuvo un $r^2 = 0,9561$ y el valor máximo de pendiente de la curva de regresión (0,44).

Tabla 3.12. Determinación de la concentración óptima de competencia del EI (TEI-0309)

Dilución/Concentración de competencia TEI-0309	r^2	b	Exactitud CC(12 000 UI/mL) Dif ($\text{Log}_{10} \text{Ce} - \text{Log}_{10} \text{Co}$)
$1:4 \times 10^6 / 18 \text{ pg/uL}$	0,8532	0,33	-2,52
$1:4 \times 10^7 / 1,8 \text{ pg/uL}$	0,9561	0,44	0,22
$1:4 \times 10^8 / 0,18 \text{ pg/uL}$	0,8897	0,37	1,03

Leyenda: r^2 : coeficiente de determinación; b: pendiente de la curva; CC: control de calidad; Dif ($\text{Log}_{10} \text{Ce} - \text{Log}_{10} \text{Co}$) diferencia entre Log_{10} concentración esperada y concentración observada.

Dicha dilución corresponde a la concentración $1,8 \text{ pg/uL}$ que permitió cuantificar el CC con una diferencia de $0,22 \text{ log}_{10} \text{ UI/mL}$, la cual se considera que es una buena exactitud ya que se acepta hasta $0,5 \text{ log}_{10} \text{ UI/mL}$ en los ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (Baylis *et al.*, 2005).

3.3.4.- Método de detección cuantitativa (MDQ) mediante la tecnología SUMA

EL MDQ utilizado para cuantificar el producto amplificado se realizó mediante hibridación en formato UMELOSA.

3.3.4.1. Selección de la concentración óptima de las sondas de captura Q5-NH₂ y S1-NH₂

En la figura 3.6 se muestra la curva de Fluorescencia (UF) vs Concentración de las sondas Q5-NH₂ (VHC) y S1-NH₂ (EI), obtenida con el tercer punto de la curva estándar VHC (C3) de $2,81 \times 10^5 \text{ UI/mL}$ (Lote 1) y los CN.

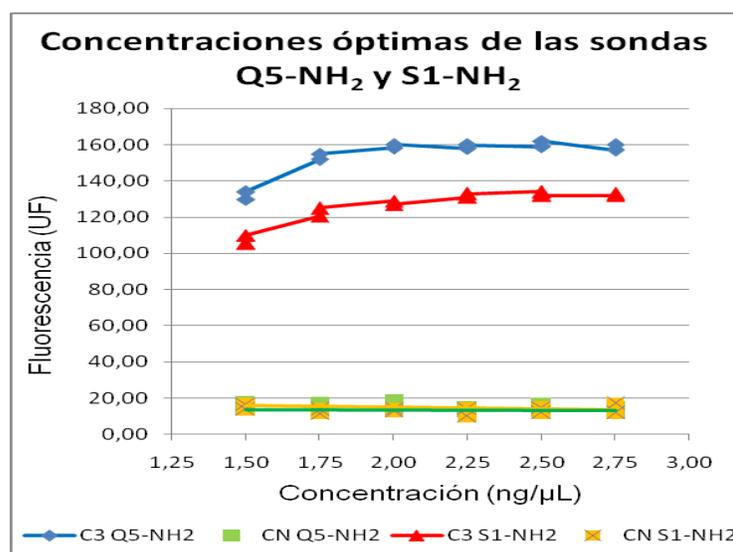


Figura 3.6. Determinación de la concentración óptima de las sondas de captura Q5-NH₂ y S1-NH₂. Con Na₂CO₃ 0,1 mol/L, pH 9 se diluyeron las sondas Q5-NH₂ y S1-NH₂ a las concentraciones de recubrimiento 1,5; 1,75; 2; 2,25; 2,5 y 2,75 ng/μL. Se recubrieron umplacas con cada una de las preparaciones a razón de 30 μL por pozo. Se continuó el proceso como se describe en el acápite 2.2.7.1. Para la selección de la mejor concentración de recubrimiento, a tres réplicas del tercer punto de la curva estándar VHC (C3: 2,81x10⁵ UI/mL; Lote 1) y tres del CN se les realizó el aislamiento del ARN según el MEO (acápites 2.2.5). Se realizó la amplificación por RT-PCR competitiva (Tabla 2.4). La detección se realizó según el acápite 2.2.8 y los resultados se interpretaron según los acápites 2.2.8.3 y 2.2.8.4.

Como se aprecia en el gráfico, a partir de 1,75 ng/μL se alcanza la meseta para la sonda Q5-NH₂, resultado similar al obtenido para el ensayo cualitativo. Para la sonda S1-NH₂ se observa que a 2 ng/μL se alcanza prácticamente la meseta, pero se seleccionó una concentración de trabajo de 2,5 ng/μL, para garantizar una correcta detectabilidad del EI, pues su amplicón es de menor tamaño que el de VHC y está en desventaja para ser capturado. Las concentraciones de 2 ng/μL y 2,5 ng/μL fueron finalmente seleccionadas para las sondas Q5-NH₂ (VHC) y S1-NH₂ (EI), respectivamente. Los niveles de fluorescencia de las muestras negativas fueron diez veces inferiores a los valores de fluorescencia del punto C3 de la curva VHC, a lo largo de todas las concentraciones de recubrimiento evaluadas.

3.4. Evaluación del ensayo UMELOSA® VHC CUANTITATIVO

3.4.1. Especificidad clínica

Todas las muestras negativas estuvieron por debajo del primer punto de la curva de cuantificación del ensayo y mostraron una especificidad clínica del 100%. Al procesar estadísticamente se demostró que para las 22 muestras negativas pareadas de suero y plasma humano no se observaron diferencias significativas entre ellas (media, $p=0,2116$ y varianzas, $p=0,7873$; prueba exacta de Fisher, $p<0,05$) Esto indica una especificidad clínica del 100%, lo que evidencia que esta prueba es capaz de discriminar adecuadamente las muestras negativas de las que están por debajo del límite de cuantificación.

3.4.2. Especificidad Analítica o Reactividad cruzada

Las 38 muestras negativas a anti-VHC y positivas confirmadas a diferentes patologías se evaluaron en el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO y todas resultaron negativas por el mismo, lo cual evidencia que no existe reactividad cruzada con ninguna de estas entidades, para una Especificidad Analítica del 100 %. Ver ANEXO 4.

3.4.3. Especificidad y Sensibilidad Genotípica

Al evaluar el Panel de Genotipado 02/202, se observó que los seis genotipos se detectaron a 1000 UI/mL, el 100 % de las veces ensayadas, como se muestra en la figura 3.7.

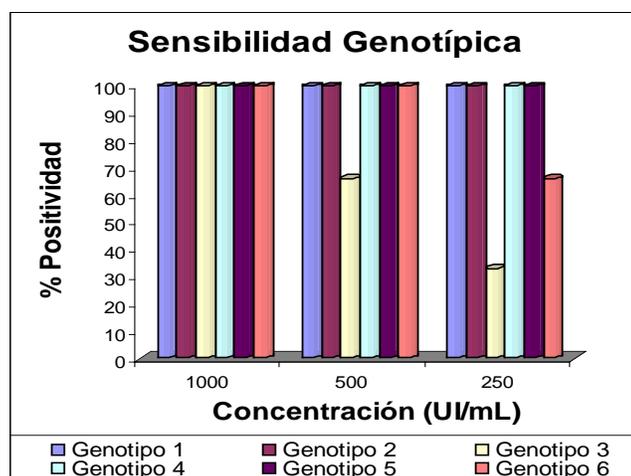


Figura 3.7. Resultados de la sensibilidad genotípica del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO frente al Panel de Genotipado 02/202 del NIBSC, con los seis genotipos del VHC a diferentes concentraciones: 1000 UI/mL ($n= 3$); 500 UI/mL ($n= 3$); 250 UI/mL ($n= 3$) y 125 UI/mL ($n= 2$), evaluados en tres ensayos diferentes y con diferentes analistas. Los seis genotipos se detectan a 1 000 UI/mL el 100 % de las veces, los genotipos 3 y 6 son los menos detectables.

Al evaluar el Panel de Genotipado 02/202, se observó que los seis genotipos se detectaron a 1000 UI/mL, el 100 % de las veces ensayadas, como se muestra en la figura 3.7.

El ensayo presenta buena sensibilidad hasta 500 UI/mL para todos los genotipos evaluados, excepto para el genotipo 3. Incluso a 250 UI/mL, todos los genotipos excepto el 3 y el 6, mostraron un 100 % de positividad.

La especificidad y exactitud genotípica se determinó en 35 muestras de dos estudios de diferentes poblaciones de pacientes positivos al ARN del VHC realizados en nuestro país, en los cuales solo se detectaron pacientes de los genotipos 1, 2, 3 y 6. Los resultados obtenidos en la cuantificación de los diferentes genotipos del VHC (ANEXO 6), muestran que la totalidad de las diferencias entre los \log_{10} del valor obtenido y la referencia son inferiores a $\pm 1 \log_{10}$, con el 94,3 % (32/35) de los valores por debajo de $0,4 \log_{10}$. El promedio total de las diferencias de \log_{10} es de **0,16** y para cada genotipo es de: **0,17** (genotipo 1), **0,16** (genotipo 2), **0,20** (genotipo 3) y **0,09** (genotipo 6), donde todas son inferiores a $\pm 0,5 \log_{10}$, por lo que se evidencia muy buena exactitud (Baylis *et al.*, 2005) en la cuantificación de todos los genotipos pues, aunque no se evaluaron en este ensayo muestras de los genotipos 4 y 5, sí fue posible evaluarlas en el ensayo de sensibilidad genotípica y su detectabilidad fue del 100 % hasta 250 UI/mL.

En el gráfico de la figura 3.8 también se muestra la regresión lineal entre los valores observados (UMELOSA) y referencia (CIGB/LISIDA) para las muestras de los distintos genotipos, para una r de 0,9576, lo cual también corrobora la buena correlación existente entre ambos resultados.

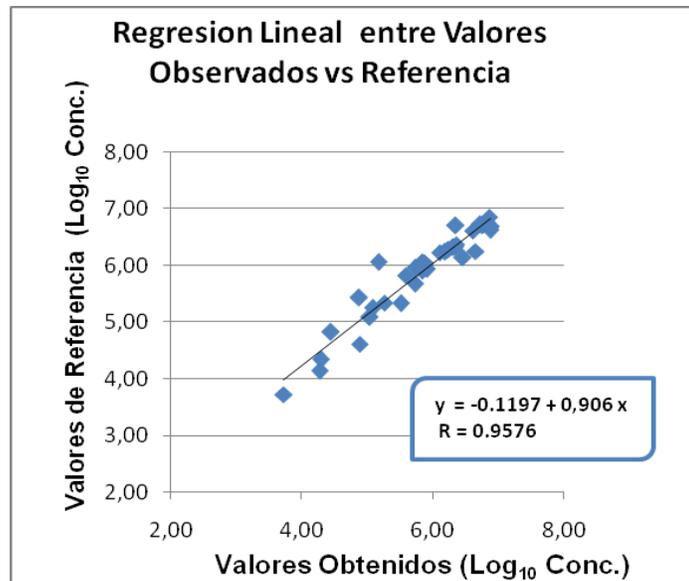


Figura 3.8. Regresión lineal entre valores Observados (UMELOSA) vs Referencia (LISIDA-CIGB). Se emplearon 35 muestras de los genotipos 1, 2, 3 y 6, puras o diluidas 1:10 o 1:100 para garantizar que estuvieran dentro del rango de cuantificación del estándar VHC y que pudieran cuantificarse con exactitud. Se ensayaron cuatro veces las muestras con el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO y se comparó con los resultados obtenidos en LISIDA/CIGB con el COBAS AmpliPrep / COBAS TaqMan HCV test.

La gran variabilidad que se describe en la determinación de la carga viral para los diferentes genotipos (Huarte y Casi, 2004; Márquez-Rosales *et al.*, 2008) solo se apreció en el estudio de sensibilidad genotípica para los genotipos 3 y 6 a 500 UI/mL y 250 UI/mL, pero a concentraciones inferiores al LD 95 % (693,12 UI/mL) del ensayo, lo cual no se evidenció en el estudio de especificidad y exactitud genotípica.

3.4.4. Exactitud del ensayo frente al IS de ARN del VHC 96/798

El resultado de la RLP entre los Log₁₀ Concentración observada vs. Log₁₀ Concentración esperada del IS se muestra en la figura 3.9. Se determinó el valor de la pendiente ($b = 0,9729$), el coeficiente de correlación ($r = 0,9964$) y el coeficiente de determinación ($r^2 = 0,9928$), para una $p < 0,01$, lo que evidencia una buena correlación entre los valores observados y esperados del IS y, por ende, la curva Estándar de VHC/ Estándar Interno para este ensayo, entre 1000 y 100 000 UI/mL, muestra buena exactitud.

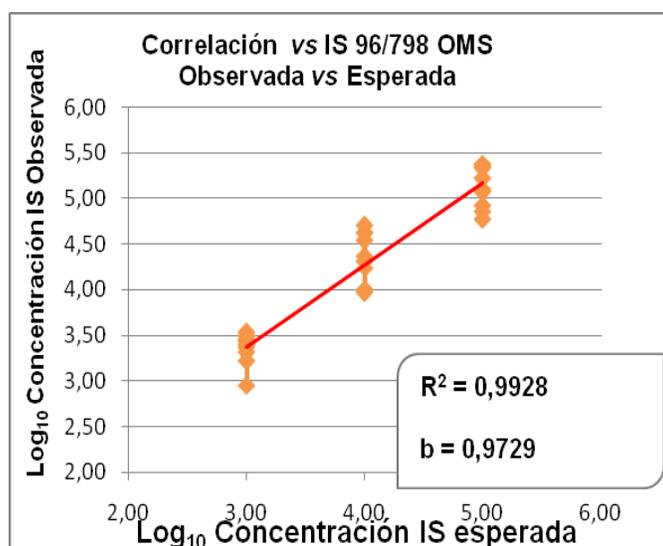


Figura 3.9. Regresión Lineal Ponderada entre los Log₁₀ concentración del IS ARN del VHC (96/798) Observado vs Esperado. Se utilizó el IS 96/798 a 100 000 UI/mL, 10 000 UI/mL y 1 000 UI/mL. Se evaluaron tres réplicas de cada punto por operarios diferentes

3.4.5. Rango lineal del ensayo

Se determinó el rango lineal de cuantificación del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO con el IS 96/798 y el ERS CP1107. En la Figura 3.10.A se muestra la curva obtenida con el IS. Como muestra la línea de tendencia, a valores menores de 2000 UI/mL y superiores a 300 000 UI/mL se observan inflexiones en la curva. Por otra parte, el estudio fue extendido con la determinación del rango lineal utilizando el ERS CP1107 (Figura 3.10.B). La curva muestra linealidad en todo el rango de cuantificación estudiado (3000 UI/mL a 150 000 UI/mL), que se encuentra dentro del rango lineal determinado con el IS.

Estos resultados permiten deducir que el rango lineal de cuantificación del ensayo es de **2000 a 300 000 UI/mL**, por lo que no se recomienda trabajar fuera de este rango y las muestras con más de 300 000 UI/mL de ARN del VHC deben ser diluidas (Tholen *et al.*, 2010).

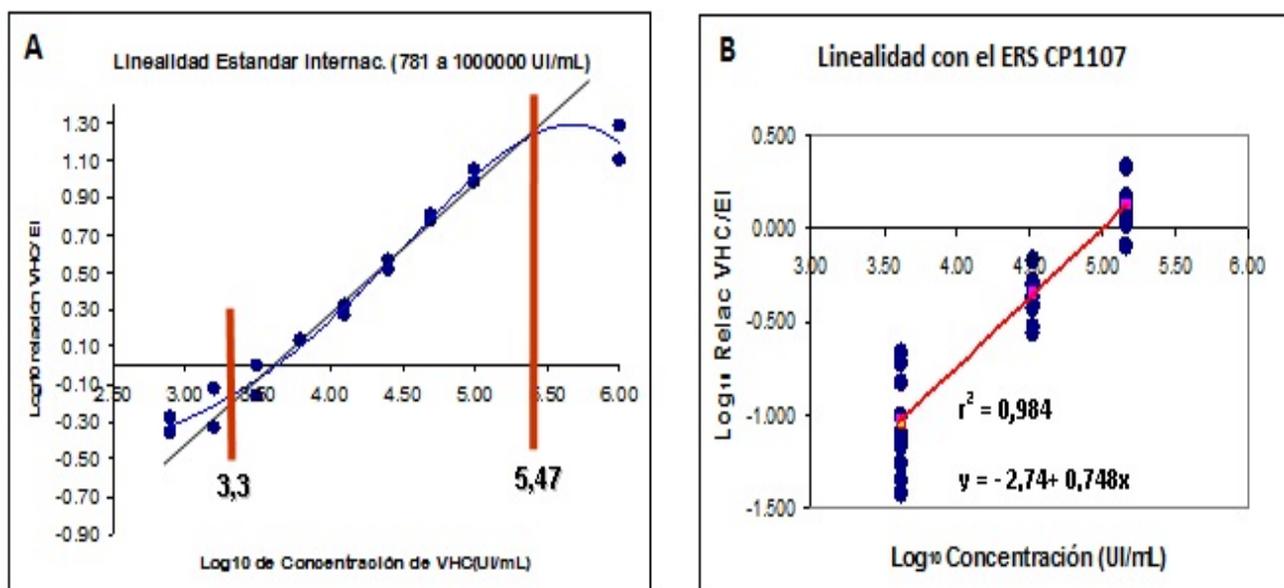


Figura 3.10. Determinación del rango lineal empleando: **A)** IS de ARN del VHC (96/798), se evaluaron diluciones del mismo desde 100 000 UI/mL hasta 781,25 UI/mL en diferentes montajes y con diferentes operarios y **B)** ERS CP1107 a $2,67 \times 10^6$ UI/mL de ARN del VHC se realizaron diluciones seriadas 1:10, se evaluaron seis réplicas de cada una, en varios días y con analistas diferentes.

3.4.6. Sensibilidad o límite de detección al 95 % del ensayo

En la tabla 3.13 se muestra el porcentaje de positividad de detección de la concentración de ARN del VHC para diluciones seriadas del ERS CP1107 realizadas en diferentes condiciones de trabajo.

Tabla 3.13. Valores para determinar el LD al 95 % del ensayo

Concentración ARN del VHC (UI/mL)	Nº Réplicas	Nº de Resultados Positivos	% de Positivos
267 000	5	5	100
26 700	6	6	100
2 670	10	10	100
2 000	29	29	100
1 000	29	28	96,6
500	29	27	93,1
267	10	7	70
250	29	20	69
133,5	6	3	50
125	29	16	55,2
62,5	29	9	31,0

Al evaluar los datos de la Tabla 3.13 por el análisis probabilístico PROBIT (Finney, 1971), se obtuvo la tabla de percentiles (ANEXO 7) donde se observa que el LD al 95 % del ensayo UMELOSA® VHC CUANTITATIVO es de **693,12 UI/mL** con un intervalo de confianza de **542,28 a 1031,52 UI/mL**.

3.4.7. Reproducibilidad

Se compararon los CVar obtenidos en los ensayos de reproducibilidad intraensayo e interensayo. La tabla 3.14 refleja los resultados de la reproducibilidad intraensayo. Los CVar intraensayo difieren para cada zona de la curva: menores de 43,7% en UI/mL y de 1,63% para los valores de log₁₀UI/mL en la zona baja y menores de 27,1% en UI/mL y de 1,43% para los log₁₀UI/mL en las zonas media y alta. No obstante, al comparar las diferencias de log₁₀ entre los valores esperados y observados para cada concentración se aprecia que en todos los casos son inferiores al valor de 0,5 log₁₀ establecido por la FDA (*FDA Guidance for Industry*, 2011).

Tabla 3.14. Reproducibilidad Intraensayo del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO

ERS CP1107 n= 12 (x 10 ³ UI/mL)	Media (UI/mL) (x 10 ³)	DE (UI/mL) (x 10 ³)	CVar (UI/mL) (%)	Media Log ₁₀	DE Log ₁₀	CVar Log ₁₀ (%)	Diferencia e/ Log ₁₀ esp.y obs.
200,0	133	28,8	21,6	5,12	4,46	1,33	- 0,18
53,4	51,9	14,1	27,1	4,71	4,15	1,43	- 0,01
27,0	24,8	1,07	43,7	3,39	3,03	1,63	- 0,04
10,7	31,6	10,9	34,4	4,49	4,04	1,54	0,46
4,27	6,45	2,19	33,9	3,81	3,34	1,53	0,18

Leyenda: DE: Desviación Estándar; n: número de réplicas; CVar: Coeficiente de variación; Diferencia e/ Log₁₀ esp.y obs.: Diferencia entre Log₁₀ esperados y observados.

Para determinar la reproducibilidad interensayo también se calcularon los CVar para cada muestra de montajes en diferentes días y por distintos operarios, como se aprecia en la tabla 3.15. Los CVar interensayos en la zona baja de la curva fueron inferiores a 57,2 % y 1,7%, para la concentración (UI/mL) y su log₁₀, respectivamente.

Tabla 3.15. Reproducibilidad Interensayo del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO

ERS CP1107 n= 24 (x 10 ³ UI/mL)	Media (UI/mL) (x 10 ³)	DE (UI/mL) (x 10 ³)	CVar (UI/mL) (%)	Media Log ₁₀	DE Log ₁₀	CVar Log ₁₀ (%)	Diferencia e/ Log ₁₀ esp.y obs.
200,0	157	68,4	43,6	5,20	4,83	1,64	- 0,10
53,4	53,1	17,2	32,3	4,73	4,24	1,51	- 0,002
27,0	11,4	0,065	57,2	3,97	2,81	1,75	- 0,62
10,7	26,1	10,7	40,8	4,42	4,03	1,61	0,39
4,27	9,1	3,68	40,4	3,96	3,56	1,60	0,33

Leyenda: DE: Desviación Estándar; n: número de réplicas; CVar: Coeficiente de variación; Diferencia e/ Log₁₀ esp.y obs.: Diferencia entre Log₁₀ esperados y observados.

En la zona media y alta de la curva son menores de 43,6 % (UI/mL) y de 1,64 para su log₁₀. También cuando se compararon las diferencias de log₁₀ entre los valores esperados y observados para cada concentración, se puede apreciar que las mayores diferencias se encuentran en la zona baja de la curva (- 0,62) y en el resto de los casos son inferiores a 0,5 log₁₀.

3.4.8. Robustez

Este parámetro se determina para evaluar la influencia de pequeños cambios en las condiciones analíticas sobre la fiabilidad del método, lo que permite localizar factores que originan fluctuaciones y aquellos que originan variaciones significativas. Las concentraciones de las nueve muestras negativas resultaron inferiores al primer punto de la curva Estándar VHC. A las muestras positivas (IS 06/100 a las concentraciones 1000, 10 000 y 100 000 UI/mL) se les determinó el CVar de su carga viral (Tabla 3.16). Los valores de CVar de las muestras positivas se encuentran entre 31 % y 49,5 % (1,49 a 1,64 % del log₁₀), resultado muy similar a los obtenidos en los ensayos de reproducibilidad.

Tabla 3.16. Coeficiente de variación de las muestras positivas del ensayo de Robustez

IS 06/100	Media (UI/mL)	CVar UI/mL (%)	CVar Log ₁₀ (%)	Dif. e/ Log ₁₀ esp. y obs.
100 000	1,25 x 10 ⁵	43,5	1,64	0,09
10 000	2,28 x 10 ⁴	49,5	1,69	0,36
1000	1,40 x 10 ³	31,1	1,49	0,15

Leyenda: IS: Estándar Internacional 06/100; CVar: coeficiente de variación; Dif. e/ Log₁₀ esp y obs: diferencia entre los Log₁₀ esperados y observados

Según la tabla 3.16, las diferencias entre los \log_{10} esperados y observados de la concentración de ARN en las muestras están por debajo de $0,5 \log_{10}$, lo que indica buena exactitud y robustez del ensayo.

3.4.9. Comparación con el estuche comercial AMPLICOR HCV MONITOR® v 2.0

Los resultados de la evaluación de 86 muestras de pacientes (51 del IGE y 35 del CIGB/LISIDA) por el estuche comercial AMPLICOR HCV MONITOR® v 2.0 y el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO se muestran en la figura 3.11 y en los ANEXOS 6 y 8.

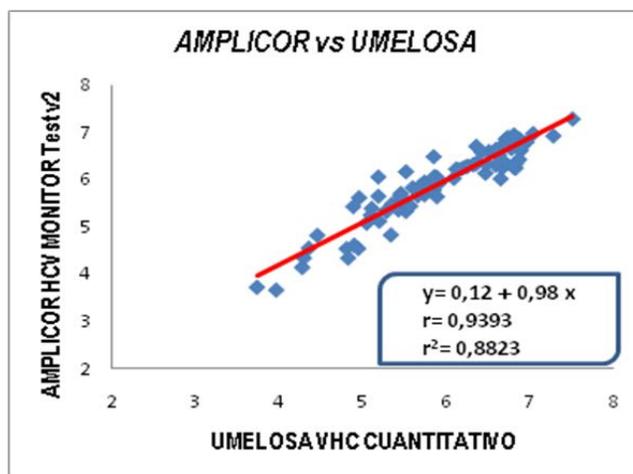


Figura 3.11. Correlación entre el AMPLICOR HCV MONITOR® Test, v 2.0 y el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO. Se evaluaron 86 muestras (ver Tabla 2.2) por ambos ensayos. r : coeficiente de correlación y r^2 : coeficiente de determinación

Se construyó la curva de regresión lineal con los resultados obtenidos por ambos estuches (Figura 3.11), se calculó la ecuación de la recta: $y = 0,12 + 0,98 x$, el coeficiente de correlación $r = 0,9393$ y el coeficiente de determinación $r^2 = 0,8823$. Se obtuvo un promedio de las diferencias de \log_{10} de $0,21$, inferior al valor de $0,5 \log_{10}$ establecido como límite de buena exactitud (FDA Guidance for Industry, 2011). El 90,7 % de las muestras mostró una diferencia de \log_{10} por debajo de $0,5$ y solo el 9,3 % estuvo entre $0,5$ y $0,88 \log_{10}$.

3.5. Análisis económico de la factibilidad de producción de ambos estuches

Dentro del análisis de la eficiencia económica se analiza el costo de producción. Este es la expresión en forma monetaria de los gastos de una organización para producir. Lo económico que resulta del trabajo de una organización está dado por el costo de producción, el cual muestra la cuantía de los insumos utilizados en la producción de bienes y servicios (Goldratt, 1990). La producción de los ensayos desarrollados se lleva a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y en el Área de producción de la Subdirección de Inmunoquímica del

CIE, donde se cuenta con el equipamiento tecnológico necesario para realizar estas producciones. Solo es necesario adquirir los materiales gastables y las materias primas necesarias para su producción.

3.5.1. Cálculo del costo de producción de los ensayos desarrollados

Se consideró como base de cálculo, la producción de una determinación tanto del estuche UMELOSA® HCV CUALITATIVO como del estuche UMELOSA® VHC CUANTITATIVO. El valor de la producción se calculó sobre la base de los precios actuales de venta.

En las tablas 3.17 y 3.18 se desglosan los cálculos de cada elemento del costo total para ambos estuches.

Tabla 3.18. Costo de producción de una determinación del UMELOSA® HCV CUALITATIVO

<i>Elementos</i>	<i>Moneda Nacional (CUP)</i>	<i>Moneda libremente Convertible (CUP)</i>	<i>Moneda única (1CUP =1CUC)</i>
<i>Materias primas y materiales</i>	—	7,09	7,09
<i>Combustible y energía</i>	—	0,24	0,24
<i>Gasto en salarios</i>	7,34	—	7,34
<i>Seguridad Social</i>	1,03	—	1,03
<i>Fuerza de trabajo</i>	3,02	—	3,02
<i>Gastos de amortización</i>	—	1,01	1,01
<i>Otros gastos</i>	—	1,39	1,39
Total	11,39	9,73	21,12

Se observa que el valor total del costo de producción de una determinación utilizando una única moneda (establecido para el análisis económico del sector empresarial), es de \$ 21,12 para el estuche UMELOSA® HCV CUALITATIVO y de \$ 24,79 para el estuche UMELOSA® VHC CUANTITATIVO.

Tabla 3.19. Costo de producción de una determinación del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO

<i>Elementos</i>	<i>Moneda Nacional (CUP)</i>	<i>Moneda libremente Convertible (CUP)</i>	<i>Moneda única (1CUP =1CUC)</i>
<i>Materias primas y materiales</i>	—	10,21	10,21
<i>Combustible y energía</i>	—	0,24	0,24
<i>Gasto en salarios</i>	7,34	—	7,34
<i>Seguridad Social</i>	1,03	—	1,03
<i>Fuerza de trabajo</i>	3,02	—	3,02
<i>Gastos de amortización</i>	—	1,25	1,25
<i>Otros gastos</i>	—	1,70	1,70
Total	11,39	13,40	24,79

De acuerdo con el análisis del costo de una determinación de ambos estuches se aprecia que es más ventajoso producir los estuches, que comprar estuches comerciales en el mercado internacional, ya que el precio de una determinación del ensayo *AMPLICOR® HCV Test v 2.0* es de **\$ 35,00** y el de una determinación del ensayo *AMPLICOR HCV MONITOR® v 2.0* es de **\$ 40,00** según el precio de catálogo, sin incluir el costo de conservación y transportación; sin embargo, la mayor dificultad que justifica su producción nacional radica en su importación, pues debido al bloqueo económico impuesto por los Estados Unidos, la única vía de adquisición es mediante terceros países, lo que eleva el precio en más de un 20 % de su valor.

Tabla 3.20. Comparación del costo de producción anual de ambos estuches vs sus homólogos comerciales

<i>Estuches</i>	<i>Precio unitario (\$ por estuche)</i>	<i>Costo anual (40 estuches)</i>	<i>Diferencia (\$)</i>
<i>UMELOSA® HCV CUALITATIVO (96 determinaciones/estuche)</i>	2 027,52	81 100,80	-
<i>AMPLICOR® HCV Test v 2.0 (96 determinaciones/estuche)</i>	3 360,00	134 400,00	53 299,20
<i>UMELOSA® VHC CUANTITATIVO (48 determinaciones/estuche)</i>	1 189,92	47 596,80	-
<i>AMPLICOR HCV MONITOR® Test v 2.0 (24 determinaciones/estuche)</i>	1 920,00 (48 determinaciones)	76 800,00	29 203,20

La producción de ambos estuches en Cuba con la nueva tecnología es factible desde el punto de vista económico, con un ahorro anual de **\$ 53 299,20**, con las producciones actuales del UMELOSA® HCV CUALITATIVO y de **\$ 29 203,20** para el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO si se produjera igual cantidad de estuches de los dos ensayos (Tabla 3.20).

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C se ha convertido en un problema de salud en nuestro país, pues su incidencia anual ha ido en aumento y, actualmente, el 0,8 % de la población de donantes de sangre posee anticuerpos positivos al VHC (TecnoSUMA, 2013). Además, la cirrosis hepática constituye la décima causa de muerte en mujeres y la oncenava en hombres, y en ello el VHC tiene un papel preponderante (Anuario Estadístico de Salud, 2013). Esto se debe a su elevada prevalencia en determinados grupos de riesgo como: hemofílicos (59 %) (Rivero, 2009), donantes por plasmaféresis (47 %), trasplantados (79,2 %), pacientes multitransfundidos (51,6 %), pacientes con enfermedades onco-hematológicas (19,5 %), prevalencia que puede llegar hasta un 95,6 % de anti-VHC positivos en unidades de hemodiálisis (Ballester *et al.*, 2005).

En los últimos años, los resultados de diversos estudios clínicos y epidemiológicos han demostrado que el diagnóstico y tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C, no puede realizarse de forma certera sin el diagnóstico molecular del ARN viral y su cuantificación (Fryer y Minor, 2009).

En respuesta a la solicitud realizada por las autoridades de Salud Pública, sobre la necesidad de disponer de un ensayo confirmatorio para el diagnóstico del VHC y la cuantificación de la carga viral para evaluar la eficacia de los tratamientos antivirales, se estandarizaron los ensayos UMELOSA® HCV CUALITATIVO y UMELOSA® VHC CUANTITATIVO, respectivamente. Ambos ensayos cuentan con reactivos y secuencias de cebadores y sondas propios que permitieron su adaptación a nuestra tecnología SUMA, ampliamente utilizada en Cuba, lo cual resulta ventajoso para permitir la rápida introducción de los ensayos en los programas nacionales de salud así como la sostenibilidad de su producción.

Para llevar a cabo la estandarización de estos ensayos fue necesario optimizar primeramente el método de extracción de Chomczynski y colaboradores, desarrollado en 1993; para ello se redujeron a la mitad los volúmenes de muestras y reactivos y se eliminaron o unieron pasos de reacción. Así se logró reducir el procedimiento de casi dos jornadas de trabajo a 3,5 horas. En el nuevo método de extracción optimizado (MEO), se incorpora un ARN heterólogo al tampón de lisis con lo que se obtienen precipitados más visibles y bandas electroforéticas más intensas en las muestras positivas, aun a bajos niveles de ARN viral, lo cual mejora la sensibilidad y reproducibilidad del ensayo, al elevar el rendimiento de la precipitación del ARN viral. Esto se atribuye a que los agentes coprecipitantes (como el ARNt de levadura, el glucógeno y el *Pellet Paint*

de *Novagen Inc.*, Madison, EE.UU.), al ser insolubles en el isopropanol o en el etanol, forman un precipitado que atrapa al ácido nucleico en grandes cantidades y lo estabiliza termodinámicamente (Lehninger, 2009). Con este fenómeno se logra que al centrifugar se pueda extraer el sobrenadante sin peligro de arrastrar el precipitado de ARN viral, lo cual favorece el aumento del rendimiento durante la purificación. McCormick en 1995 y Taggart y colaboradores en 1998 demostraron que el uso de agentes coprecipitantes del ARN aumentaba la sensibilidad y reproducibilidad de un ensayo cualitativo de RT-PCR para enterovirus. Xu y colaboradores en 2002 obtuvieron resultados similares al utilizar el agente coprecipitante del ARN *Pellet Paint*, con ello demostraron que este ayuda a precipitar el ARN del VIH1, material genético que se encuentra en escasa cantidad en el suero humano. En ausencia del coprecipitante, la precipitación alcohólica del ARN del VIH1 tiene un pobre rendimiento lo cual genera resultados falsos negativos (Xu *et al.*, 2002). En la misma línea Wang y colaboradores en 2002 realizaron experimentos con un ARNt de levadura, mientras que Rio y colaboradores en 2010 experimentaron con el glucógeno.

Lo anterior apoya la idea de que el uso de un ARNh como agente coprecipitante también favorece la estabilidad de los ARN almacenados a 4 °C durante un año, de acuerdo con los resultados obtenidos en los estudios de estabilidad realizados a estándares de ARN almacenados en TL a 4 °C hasta 12 meses (ANEXO 3), hecho que no había sido descrito previamente y que fue motivo del otorgamiento de una patente por la OCPI (No. 23588) en 2010, ANEXO 10.

Por otra parte, en nuestros experimentos comprobamos que la introducción del ARNh no afectaba la especificidad del ensayo, pues los CN no mostraron señales, lo que indica que dicha secuencia de ARN no se amplifica por los cebadores utilizados y, por ende, no se detecta.

Posteriormente se procedió a optimizar la etapa de amplificación del ARN viral (MAO) por RT-PCR y se corroboró que la elevada concentración de dNTPs presente en el MAR, produce señales residuales mayores en las electroforesis. Sin embargo, cuando se reduce su concentración a la mitad, se favorece la obtención de electroforesis con bandas más nítidas, sin afectar la sensibilidad de la amplificación, lo cual había sido demostrado por Coleman y Tsongalis en 2006.

El Mg^{2+} es un importante cofactor enzimático dentro del mecanismo catalítico de la AMV y la *Taq* ADN polimerasa, ambas enzimas necesitan dos átomos de Mg^{2+} en su sitio activo para elevar su actividad

(Thielmann, 1973; Lehninger, 2009). Se probó que no bastaba la concentración de $MgCl_2$ en el MAR como para favorecer la actividad de la AMV y la *Taq* ADN polimerasa, por eso se fijó en 2,5 mmol/L. El Mn^{2+} es el cofactor de la enzima de *Thermus thermophilus* (*Tth*) usada en el *Amplicor HCV Test v 2.0*; en dependencia de la concentración de Mn^{2+} , la *Tth* actúa como ADN polimerasa o como transcriptasa inversa (Rose *et al.*, 2003). En el MAO se introdujo un inhibidor de RNasas con el objetivo de disminuir los falsos negativos debido al efecto de las RNasas exógenas que pueden afectar el ensayo durante su ejecución. Las fuentes más comunes de estas enzimas son las inherentes a las muestras que proceden de células y tejidos, la grasa de los dedos y las bacterias y hongos ambientales presentes en el polvo y el aire (Pasloske y Wu, 1998; Muller *et al.*, 2004; Liegler y Grant, 2006).

Encontramos que otros ensayos de detección de retrovirus por RT-PCR utilizan concentraciones muy similares de reactivos, por ejemplo, Kleiboeker en 2003 desarrolló un ensayo para la detección y cuantificación del ARN del virus del Oeste del Nilo. En el mismo emplea cebadores a 0,6 $\mu\text{mol/L}$, dNTPs a 0,2 mmol/L y $MgCl_2$ a 2,5 mmol/L. En los ensayos cualitativo y cuantitativo utilizamos los cebadores a 0,5 $\mu\text{mol/L}$ y 1 $\mu\text{mol/L}$, respectivamente, concentraciones que se encuentran dentro del intervalo recomendado para las reacciones de PCR (0,1-1 $\mu\text{mol/L}$) (Rose *et al.*, 2003). La utilización de cebadores a concentraciones superiores a 1 $\mu\text{mol/L}$ puede provocar la formación de dímeros, lo que hace menos eficiente la amplificación del producto deseado de PCR. También pueden ocurrir uniones inespecíficas de los cebadores a otras regiones con la consiguiente síntesis de productos no deseados y, en consecuencia, el aumento de la señal de fondo, que es muy difícil de eliminar y reduce la sensibilidad de la detección (Wang y Wu, 1994; Brownie *et al.*, 1997).

Kleiboeker en 2003 también utilizó un estándar interno para su ensayo cuantitativo, dicho estándar compete con el ARN blanco y permite su cuantificación absoluta lo cual hace que los resultados sean comparables en el tiempo (Freeman *et al.*, 1999). Además, el EI aumenta la eficiencia de la extracción del ARN viral pues detecta los inhibidores endógenos de la RT-PCR (fuente de falsos negativos) y sirve de control de calidad de dicha amplificación ya que elimina los errores tubo a tubo en el ensayo.

Al desarrollar la etapa de detección para el SUMA, mediante hibridación a una ultramicroplaca de poliestireno, observamos que la solución de recubrimiento más adecuada fue la de carbonato de sodio 0,1 mol/L a pH 9 con las sondas Q3 y Q3-NH₂. De éstas, la última presenta la mayor señal, lo cual indica que el grupo amino

favorece la unión a la umplaca de poliestireno. Esto pudiera deberse a que las umplacas de poliestireno tienen carga negativa a pH 9 y establecen interacciones electrostáticas con el grupo amino cargado positivamente presente en las sondas. También es probable la formación de puentes de hidrógeno entre el poliestireno y los grupos aminos (Lehninger, 2009), por ello, la sonda que presenta dichos grupos produce señales más altas que las que no los portan. Además, el hecho de que las dos sondas Q3 (con o sin NH₂) presenten las mayores señales de fluorescencia nos indica que el acceso del amplicón complementario a ellas y la hibridación de ambos, están más favorecidos que el acceso y la hibridación del amplicón complementario a las sondas Q4, probablemente por efectos estéricos que estén bloqueando el acceso eficiente entre las sondas Q4 y su amplicón complementario (Tijssen, 1993). Por lo anterior, solamente se seleccionó la sonda de captura Q3-NH₂ para el ensayo de detección, aunque ello implicó detectar la mitad de los amplicones totales que se producen en la amplificación y ésta puede ser una de las causas de que la detectabilidad del ensayo no sea mayor, aspecto a mejorar en el futuro.

La solución de glutaraldehído rindió niveles más bajos de fluorescencia que la de carbonato de sodio 0,1 mol/L a pH 9, esto pudiera deberse a que el glutaraldehído reacciona principalmente con los grupos NH₂ como una base de Schiff y su interacción con los grupos hidroxilos no está tan favorecida, por lo que pudiera ocurrir un entrecruzamiento entre las sondas a través del grupo amino y unirse una de ellas al poliestireno, lo cual produce una estructura inestable propensa a desprenderse parcialmente en los procesos de lavados y con ello disminuye la señal de fluorescencia (Moss, 2001). Este resultado se corroboró cuando se diseñaron las sondas de captura para el ensayo cuantitativo, pues también se prepararon sondas Q5 y S1 con y sin grupos aminos y los mejores resultados se obtuvieron para las sondas aminadas (resultados no mostrados).

La concentración de sonda seleccionada para ambos ensayos está dentro del rango recomendado para los ensayos de hibridación *in situ*: 0,5 a 10 ng/μL (Tijssen, 1993). También se aconseja que se utilice una concentración que esté dentro de la meseta de la curva de Fluorescencia (UF) vs Concentración de las sondas, no obstante, si se utiliza un exceso de sonda (>10 ng/μL) puede reducirse la señal a una tercera parte, en lugar de aumentar la detectabilidad. Esto se explica por el llamado efecto gancho que hace que se pierda gran parte de la señal por desprendimiento, durante los lavados, del complejo amplicón-sonda, sobre todo cuando se utilizan las umplacas cuyos pocillos son muy pequeños, de solo 35 μL de capacidad (Tijssen,

1993). Los ensayos que utilizan microplacas (pozos con capacidad para 200-250 μL) emplean la sonda entre 200 y 300 $\text{ng}/\mu\text{L}$, lo cual equivale a lo utilizado por nosotros con una capacidad del pocillo diez veces menor (Instructivo del ensayo *AMPLICOR® HCV Test, v 2.0, Roche MS Inc., 2001*; Kleiboeker, 2003; Instructivo del ensayo *AMPLICOR HCV MONITOR® Test, v 2.0, Roche MS Inc., 2004*).

La evaluación de los dos ensayos UMELOSA® se realizó según las guías nacionales e internacionales de validación para ensayos NAT (CECMED, Regulación No. 47-2007, ECCLS, 1999; FDA, *Guidance for Industry*, 2011). El ensayo cualitativo presenta una especificidad clínica de 99,15 % (n= 118) ya que se obtuvo un falso positivo. Esto evidencia el riesgo real de contaminaciones cruzadas o ambientales por aerosoles de amplicones, por la frecuente apertura de los tubos en el paso de transferencia de la RT-PCR a la PCR2, por eso la desinfección diaria con hipoclorito de sodio al 10 % y luz ultravioleta de 5 a 20 minutos es vital para controlar el ambiente y así disminuir la ocurrencia de falsos positivos (Aslanzadeh, 2004). Al evaluar en ambos ensayos sueros y plasmas negativos, se probó que no existen diferencias significativas entre estos (cualitativo: $p= 0,1818$; cuantitativo: $p= 0,2116$, prueba de Fisher, $p<0,05$), ni entre los positivos (cualitativo: $p= 0,2753$; cuantitativo: $p= 0,9715$, prueba T Student, $p<0,05$) lo cual valida ambos tipos de muestras. El estudio de especificidad clínica del *Versant HCV ARN v3.0* con 1 000 sueros y 1 504 plasmas rindió resultados similares a los nuestros ($p= 0,5$, prueba de Fisher, $p<0,05$), pero produjo nueve falsos positivos, que al ser reevaluados dieron negativos, con lo que se alcanzó una especificidad clínica de 99,6 %, (n= 2504) (Gorrin *et al.*, 2003). El *AMPLICOR® Hepatitis C Virus, v 2.0* presentó una especificidad clínica de 100 % (n= 495), pero este ensayo utiliza la enzima N-uracil glicosilasa (Longo *et al.*, 1990) que destruye todos los posibles amplicones que existan en la muestra antes de comenzar la amplificación y esto disminuye al mínimo la contaminación por arraste (Instructivo del estuche *Amplacor HCV Test v 2.0, 2001*). Por los resultados obtenidos para ambos ensayos, se pueden emplear muestras de suero y plasma humano, siempre y cuando este último se obtenga con los anticoagulantes CPDA-1 o EDTA y nunca con heparina porque inhibe el ensayo y es fuente de falsos negativos y de muestras no cuantificables (Holodniy *et al.*, 1991; Kleiboeker, 2003).

Hasta 1997, los ensayos de determinación del ARN del VHC no mostraban el mismo resultado para una muestra, e incluso usaban diferentes unidades de cuantificación (Kamili *et al.*, 2012). Debido a la importancia de una determinación más exacta para el correcto seguimiento de los pacientes en tratamiento, la OMS

estableció el primer Estándar Internacional de ARN del VHC en Unidades Internacionales (UI), las cuales son usadas en la actualidad por todos los ensayos (Saldanha *et al.*, 1999). El trabajo conjunto de la OMS, la FDA y la EMEA ha permitido armonizar los requerimientos de especificidad y sensibilidad para los ensayos NAT empleados en las pruebas para la liberación de bolsas de sangre en los bancos de sangre. Igualmente ocurre con las unidades utilizadas para expresar la CV de los estándares y materiales de referencia disponibles para el control de estas técnicas, pues hasta hace unos años se utilizaban indistintamente las unidades de copias por mL (cop/mL) y los genomas equivalentes por mL (geq/mL). La FDA exige para la pesquisa de VHC en bolsas de sangre individuales una sensibilidad o LD del 95 % de 5000 UI/mL (*FDA Guidance for Industry*, 2011), mientras que para evaluar mezclas de plasmas en bancos de sangre o para utilizar hemoderivados en Europa, se exige una sensibilidad mínima igual o menor a 100 UI/mL (Tabor, 1999; Saldanha *et al.*, 2000). La sensibilidad del ensayo cualitativo (101,7 UI/mL) cumple con lo exigido por las regulaciones internacionales para la pesquisa de bolsas de sangre o plasma para hemoderivados, siempre y cuando el número de bolsas a mezclar se regule de acuerdo a la sensibilidad del ensayo, en nuestro caso las mezclas serían de 50 bolsas, teóricamente, pero la práctica ha demostrado que lo más recomendable es trabajar con mezclas de 24 bolsas y así minimizar el riesgo de que una bolsa positiva, con una CV muy baja, escape a la pesquisa (Fryer y Minor, 2009). Al evaluar el IS (Tabla 3.9), se observa que 100 UI/mL (n =24) se detecta el 88 % de las veces y esto puede deberse al bajo número de réplicas realizado para cada dilución del estándar (n= 24); un estudio similar del *AMPLICOR® HCV Test v 2.0* detecta 50 UI/mL del IS 96/790 el 100 % de las veces, con n= 108 (Instructivo del estuche *Amplicor HCV Test v 2.0*, 2001).

Debemos señalar que aunque es analítica y clínicamente favorable contar con ensayos muy sensibles para la detección temprana y el monitoreo de terapias (cuya efectividad se basa en alcanzar CV muy bajas en cortos periodos de tiempo para poder detectar si hay resistencia a fármacos antivirales o no), sí se puede afirmar que clínicamente, y sobre todo para la confirmación del diagnóstico, no es significativamente diferente que un ensayo tenga un LD del 95 % de 100 o 1 000 UI/mL, pues en investigaciones realizadas por el NIBSC, durante el inicio de la infección, la rampa de subida de la CV del VHC es muy alta, 2,5 veces mayor que la del VIH y la del VHB (Saldanha *et al.*, 2000), lo cual permite que el VHC sea detectado por RT-PCR a partir de los 12 días de su infección, dado que los valores de CV pueden llegar a ser de 6-8 log₁₀ (Tabor *et al.*, 1999).

No obstante, en la actualidad los productores de ensayos cualitativos compiten por alcanzar niveles más bajos de detección, ejemplo de ello son los ensayos producidos por *Roche Molecular Systems* (Pleasanton, EE.UU.), líder de este mercado: el *AMPLICOR® HCV Test v 2.0*, tiene un LD del 95 % de 60 UI/mL en suero y de 50 UI/mL en plasma (Martins *et al.*, 2013), el del *COBAS AMPLICOR® HCV Test v 2.0* es de 60 UI/mL en suero y de 50 UI/mL en plasma (Cabezas-Fernández y Cabeza-Barrera, 2012) y el del *COBAS Ampliprep/Cobas Taqman HCV Test* (aunque es otro principio de ensayo, PCR en tiempo real y diseñado específicamente para pesquisa en banco de sangre) es de 28 UI/mL (Vermehren *et al.*, 2011). Estos niveles tan bajos de detección no solo buscan detectar cada vez más tempranamente un paciente en período de ventana (fase aguda de la enfermedad), detectar al paciente en la pesquisa de bancos de sangre y así disminuir a cero la transmisión por esta vía, o monitorear adecuadamente el tratamiento, sino que también aseguran un mercado muy lucrativo y casi exclusivo para las grandes empresas productoras de diagnosticadores en el mundo (*Roche, Siemens y Abbott*), lo cual hace incosteable que un país en vías de desarrollo utilice ensayos comerciales de esta "calidad" para el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de su población, de forma gratuita. Por ello, el contar con un ensayo propio, cuya producción sea sustentable y esté a la disposición de nuestros programas nacionales de salud, nos permite disponer de una herramienta de trabajo muy valiosa, aún cuando no alcance valores tan bajos de detectabilidad pero que sí posee una sensibilidad y calidad que cumplen con los requerimientos establecidos internacionalmente para los ensayos NAT.

Los primeros ensayos NAT para VHC, tanto cualitativos como cuantitativos, presentaban niveles distintos de exactitud en la cuantificación de determinados genotipos, ejemplo de ello es que la mayoría de los ensayos subestimaban el genotipo 3 (Pawlotsky, 1999; Pawlotsky, 2003a; Morishima, 2004, Mauss *et al.*, 2012). La evaluación del panel *Pellicheck* (Tabla 3.8) en el ensayo cualitativo mostró que este detecta los genotipos 1 y 3 con porcentajes de positividad comparables con los obtenidos en el Segundo Estudio de Colaboración Internacional para la caracterización del panel, referidos en el Instructivo del panel (Instructivo del panel *Pellicheck HCV-RNA*, 2005), el cual define como una adecuada sensibilidad para estos sistemas, la equivalente a la detección de 3600 geq/mL (947,4 UI/mL) y, preferiblemente, de 900 geq/mL (236 UI/mL) para el genotipo 1 el 100 % de las veces. Nuestro ensayo logra detectar hasta 600 geq/mL (157 UI/mL) de genotipo

3 el 100 % de las veces con el nuevo oligo VHC 12n. Si consideramos el análisis de secuencia realizado para todos los genotipos (figura 3.3), podemos especular que todos los genotipos pudieran ser igualmente detectados con buena sensibilidad por el ensayo cualitativo, lo cual es muy importante porque en nuestro país, aunque el genotipo 1b es el más frecuente (Padrón *et al.*, 1995a; Roca *et al.*, 1999; Vilar *et al.*, 2007; González-Horta *et al.*, 2011; Rodríguez-Lay *et al.*, 2012), también circulan los genotipos 2, 3, 4 y 6. Al evaluar el Panel de Genotipado 02/202 con el ensayo cuantitativo, este presentó buena sensibilidad hasta 500 UI/mL para todos los genotipos evaluados, excepto para el genotipo 3; incluso a 250 UI/mL, todos los genotipos salvo el 3 y el 6, mostraron un 100 % de positividad. La variabilidad en la determinación de la CV para los diferentes genotipos también se evidencia en un estudio comparativo de las versiones 1 y 2 del ensayo *Bayer Versant HCV*, donde utilizan la tecnología del ADN ramificado (Detmer *et al.*, 1996). En él se muestra que ambos ensayos cuantifican mejor el genotipo 1 que el 2 y el 3. Para la versión 1, el porcentaje de positividad a 1000 UI/mL para el genotipo 1 es de 97 % y para los genotipos 2 y 3 es de 67 %, mientras que para la versión 2, es de 99 % para genotipo 1 y de 93 % para el 2 y el 3. Además, plantean que el genotipo 6 es 1,5 veces menos detectable por la versión 1 que por la 2. Esto puede deberse a la gran variabilidad viral entre genotipos e incluso dentro del mismo genotipo y a que es muy complejo detectar todos los genotipos con igual sensibilidad con solo un juego de cebadores (Huarte y Casi, 2004; Desombere *et al.*, 2005; Márquez-Rosales *et al.*, 2008). Otro estudio que evaluó el Segundo Panel de Proficiencia de la Unión Europea para la Acción Concertada para la hepatitis C por el ensayo *COBAS AMPLIPREP/ COBAS AMPLICOR HCV MONITOR*, mostró una cuantificación menor para el genotipo 3 que la referencia del panel (Erali *et al.*, 2000).

La especificidad y la exactitud genotípica del ensayo cuantitativo se determinaron con muestras de los genotipos 1, 2, 3 y 6. Los resultados obtenidos en la cuantificación de los genotipos del VHC (ANEXO 6) muestran que la totalidad de las diferencias entre los \log_{10} del valor obtenido y la referencia son inferiores a $\pm 1 \log_{10}$, con el 94,3 % (32/35) de los valores por debajo de $0,4 \log_{10}$. El promedio total de las diferencias de \log_{10} es de 0,16 y para cada genotipo es de: 0,17 (genotipo 1), 0,16 (genotipo 2), 0,20 (genotipo 3) y 0,09 (genotipo 6), donde todas son inferiores a $\pm 0,5 \log_{10}$, esto es evidencia de muy buena exactitud (Baylis *et al.*, 2005) en la cuantificación de todos los genotipos pues, aunque no se evaluaron en este ensayo muestras de los genotipos 4 y 5, sí lo fueron en el ensayo de sensibilidad genotípica para una detectabilidad de 100 %

hasta 250 UI/mL. La gran variabilidad descrita en la determinación de la CV para los diferentes genotipos (Huarte y Casi, 2004; Márquez-Rosales *et al.*, 2008) solo se apreció al estudiar la sensibilidad genotípica para los genotipos 3 y 6 a 500 UI/mL y 250 UI/mL, concentraciones inferiores al LD 95 % del ensayo (693,12 UI/mL). Esto demuestra que el juego de cebadores utilizado en nuestro ensayo permite detectar y cuantificar adecuadamente los seis genotipos y es capaz de detectar todos los genotipos del virus a concentraciones cinco veces menores que las recomendadas por la FDA y las normas europeas (5 000 UI/mL) (*FDA Guidance for Industry*, 2011; Paul Ehrlich, 2003) con 100 % de positividad.

Al estudiar la especificidad analítica de los ensayos cualitativo y cuantitativo, frente a 38 muestras positivas a diferentes patógenos y negativas a anti-VHC, todas resultaron negativas por ambos ensayos, lo cual es posible debido a que la especificidad de la PCR se basa en la correcta unión del cebador al blanco de ADN y a la habilidad de la polimerasa de replicar adecuadamente la región seleccionada. Dado que a mayor temperatura máxima de hibridación (T_h) las condiciones se restringen más y disminuyen las inespecificidades (Saunders y Parkers, 1999) fue necesario que optimizáramos la T_h y estableciéramos las condiciones de astringencia. Además, en el ensayo cualitativo se realiza RT-PCR y PCR anidada, por lo que se utilizan cuatro cebadores seleccionados de la RNC 5', región altamente conservada del genoma del VHC, lo que hace aún más específica la determinación (Young *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 2000).

Los ensayos *AMPLICOR® HCV Test, v 2.0* y *AMPLICOR® HCV Monitor Test v 2.0* también muestran especificidad clínica del 100 %; el primero estudió muestras de 34 patógenos y el segundo estudió 75 muestras de 16 patógenos, todas resultaron negativas en esos ensayos (Instructivo del estuche *Amplicor HCV Test v 2.0*, 2001; Instructivo del estuche *Amplicor HCV Monitor Test v 2.0*, 2004).

No existe una concordancia absoluta entre los anticuerpos específicos al VHC y la detección del ARN viral, pues el paciente puede tener anticuerpos contra el VHC y no tener replicación viral, por haber hecho una remisión terapéutica o espontánea de la enfermedad (esta puede ser hasta de un 40 %) (OMS, 2012). Además, la respuesta del individuo infectado frente al virus es variable y depende del hospedero y los ensayos serológicos presentan inespecificidad de 2-4 % (Padrón *et al.*, 1995b). No obstante, muchos autores establecen esa relación de concordancia en sus estudios porque tienen un comportamiento similar, entre 50-75 % (Alter *et al.*, 1999), cifra que se eleva más en los grupos de riesgo. Es por ello que obtuvimos mayor

concordancia entre el UMELISA HCV y el UMELOSA® HCV CUALITATIVO cuando evaluamos pacientes del Instituto de Gastroenterología que cuando estudiamos los provenientes de banco de sangre (población supuestamente sana). Esto se debe a que los pacientes de la consulta de Gastroenterología presentan evidencias clínicas de la enfermedad y, por tanto, una mayor probabilidad de tener replicación viral. No obstante, 67 % es una cifra reducida porque el 51,1 % de dichos pacientes había completado tratamiento con interferón o interferón combinado con amantadina y no presentaba carga viral detectable, o esta era menor al límite de detección de la prueba en el momento de recolección de la muestra. Si tenemos en cuenta lo anterior, el porcentaje de concordancia debiera ser más elevado en los pacientes de consultas especializadas. En 1993 Bouchardeau y colaboradores realizaron un estudio en pacientes hemodializados y encontraron una concordancia entre anti-VHC y ARN viral del 90 % (de ellos, cuatro pacientes fueron positivos al PCR y negativos a anti-VHC a los seis meses de hemodiálisis y luego seroconvirtieron a anti-VHC). En un estudio de seroprevalencia y factores asociados a la hepatitis C realizado por Martínez y colaboradores en 2005, dentro de una población de 642 habitantes de los municipios Playa y Marianao, se encontraron cuatro anti-VHC positivos y, de estos, dos ARN positivos (concordancia del 50 %), entre ellos un caso fue de transmisión vertical y el otro fue una persona multitransfundida. Un estudio realizado por Santana y colaboradores en 2009, en unidades de hemodiálisis de la región occidental de nuestro país, mostró una prevalencia de anticuerpos al VHC de 76 % y una concordancia entre el UMELISA HCV y el UMELOSA® HCV CUALITATIVO del 55 %, lo cual demuestra la alta prevalencia de esta enfermedad en los servicios de hemodiálisis.

Al evaluar el Estándar Internacional (IS) en el ensayo cuantitativo mediante la correlación de los valores observados y esperados en una curva de RLP (figura 3.9), se obtuvo una pendiente de 0,9729, un coeficiente de correlación de 0,9964 y un coeficiente de determinación de 0,9928, para una $p < 0,01$. Esto evidencia una buena correlación entre los valores observados y esperados del IS entre 1000 y 100 000 UI/mL, lo cual implica que los valores cuantificados por nuestro ensayo tendrán buena exactitud y van a ser comparables con los obtenidos por otros ensayos, ya que el estándar VHC es un estándar secundario del IS. Valores similares a los anteriores se describen para otros ensayos como el *VERSANT HCV RNA v3.0* donde la correlación entre los valores esperados y observados del IS fue de 0,9982 y la pendiente de 1,105, lo cual indica que existe linealidad y buena correlación entre ambos resultados (Desombere *et al.*, 2005).

Al comparar con otros ensayos el rango lineal de cuantificación (2 000-300 000 UI/mL) y el LD al 95 % (693,12 UI/mL) obtenidos para el ensayo cuantitativo pudimos observar que son similares a los mostrados por el *VERSANT HCV RNA v3.0*, cuyo rango lineal de cuantificación fue de 1 500-96 000 UI/mL y con un LD al 95 % de 625 UI/mL (Trimoulet *et al.*, 2002). Además, el ensayo de referencia *AMPLICOR HCV MONITOR® Test v 2.0* describe un rango lineal de cuantificación de 600-850 000 UI/mL y un valor del LD al 95 % de 600 UI/mL (Instructivo del ensayo, *Roche Inc.*, 2004). Es necesario señalar que existen ensayos como el *Abbott Real time HCV* con rangos de cuantificación muy amplios de $12-1 \times 10^8$ y LD al 95 % de 12 UI/mL (Pyne *et al.*, 2009), como están basados en la PCR en tiempo real, donde la detección ocurre simultáneamente a la amplificación, en ellos se trabaja en una zona muy lineal de la curva de eficiencia enzimática lo cual permite que se alcancen esos valores para los parámetros mencionados. En cambio, nuestro ensayo de PCR es de punto final a saturación enzimática, trabaja en una zona de linealidad media donde no es posible alcanzar un rango lineal tan amplio. No obstante, los resultados obtenidos avalan su uso eficiente en el monitoreo de la terapia.

Al analizar la reproducibilidad intra e interensayo de los ensayos cuantitativos, encontramos autores que plantean que la exactitud es aceptable con una diferencia de hasta $1 \log_{10}$, pues es clínicamente significativo cuando la viremia varía en $\pm 2 \log_{10}$ como respuesta a la terapia antiviral (Lok y Pawlotsky, 2012). En un estudio comparativo de tres ensayos (dos de PCR en tiempo real: *Real Time HCV* y *Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan* (CAP/CTM) y uno de ADN ramificado: *Versant HCV RNA v3.0*) se observa que los CV intraensayo oscilan de 0,72 % a 1,3 % para *Real Time HCV*, de 0,55 % a 1,35 % para el ensayo de ADN ramificado y de 1,4 % a 3,02 % para CAP/CTM (Vermehren *et al.*, 2008), resultados similares a los de nuestro sistema a pesar de haber sido obtenidos con ensayos totalmente automatizados. Los CV intra e interensayo del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO están dentro del rango que muestran otros ensayos de determinación de la CV del VHC: menores de 50 % y de 60 % de UI/mL, respectivamente, valores que indican una reproducibilidad adecuada para este tipo de ensayo (Trimoulet *et al.*, 2002; Gorrin *et al.*, 2003; Caliendo, 2006).

La determinación del coeficiente de correlación entre nuevos ensayos y un ensayo de referencia, es un buen indicador de la exactitud alcanzada por el ensayo desarrollado y las mejores exactitudes se logran cuando r es mayor o igual que 0,85 (Fryer y Minor, 2009). En el intento de desarrollar nuevos ensayos, algunos autores

han explorado el genoma viral para buscar regiones más conservadas para todos los genotipos, por ejemplo Drexler y colaboradores en 2009 desarrollaron el ensayo *HCV X-Tail NAT*, con secuencias seleccionadas de la RNC 3', región esta cuyo uso ha sido siempre muy cuestionado para el diagnóstico porque en ella se encuentra el tracto de poli Uracilo que es muy proclive a la acción de las nucleasas. Con este ensayo se evaluaron 598 muestras de los genotipos del 1-6 contra el *Versant HCV RNA v3.0*, lo cual mostró coeficientes de correlación de: 0,92; 0,85; 0,95; 0,91; 0,95 y 0,96, respectivamente, para una correlación final de $r = 0,9233$, donde solo el 12 % de las muestras se desvió en más de $0,5 \log_{10}$ del valor esperado para una desviación máxima de $0,85 \log_{10}$. Una evaluación entre *AMPLICOR HCV MONITOR® v 2.0* y *Versant HCV bDNA v3.0* mostró $r = 0,86$ (Desombere *et al.*, 2005). Otro estudio comparativo entre *Real Time PCR Test* y *Cobas Amplicor HCV Test, v 2.0*, mostró $r = 0,6$. El *Real Time PCR* coincide con el *Cobas Amplicor* en 26 casos (52 %), sobrestimó 20 casos (40 %) y subestimó 4 (8 %) (Hasan *et al.*, 2012). Resultados similares se obtuvieron en una comparación entre un ensayo cualitativo "casero" (no comercial de Brasil) de RT-PCR anidada y los ensayos *Versant HCV RNA Test* (basado en la TMA) y *Cobas Amplicor HCV Test v 2.0*. Las correlaciones obtenidas fueron: $r = 85,4 \%$ entre el casero y el TMA; $r = 81,7 \%$ entre el casero y el Cobas y $r = 76,8 \%$ entre el TMA y el Cobas (Martins *et al.*, 2013). Al comparar el UMELOSA® HCV CUALITATIVO contra el ensayo *AMPLICOR® HCV Test, v 2.0*, se encontró una concordancia total entre ambos (100 %); cuando se comparó el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO contra el *AMPLICOR HCV Monitor® Test, v 2.0* se obtuvo $r = 0,9393$, así como un promedio de las diferencias de \log_{10} de 0,21, inferior a $0,5 \log_{10}$, y una variación máxima de $0,88 \log_{10}$. Los coeficientes de correlación pueden presentar valores muy disímiles, en algunos casos llegan a ser muy bajos, incluso entre ensayos de referencia. Esto evidencia la gran variabilidad que existe en estos ensayos, sobre todo en los cuantitativos y ello está asociado a lo complejo de su diseño y estandarización por ser ensayos moleculares. La reducción de tal variabilidad requerirá un enfoque multifactorial para mejorar la precisión, la confiabilidad y la utilidad clínica de los mismos, así como lograr armonizar sus resultados, meta que se han propuesto la FDA, el NIBSC y la OMS en el establecimiento de nuevas pautas para su fabricación (Hayden *et al.*, 2011).

Después de realizar el análisis económico sobre la base de los costos de producción de ambos estuches en Cuba con la nueva tecnología, vemos que es factible económicamente su fabricación, con un ahorro anual de

\$ 53 299,20 para los niveles actuales de producción del UMELOSA® HCV CUALITATIVO y de \$ 29 203,20 para el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO si se produjera igual cantidad de estuches de los dos ensayos, lo cual hace sustentable y sostenible la fabricación de estos estuches para todo el país.

Todos los resultados mostrados permiten concluir que la optimización de la extracción y amplificación, así como la detección de los productos amplificados mediante la tecnología SUMA permitieron estandarizar dos ensayos de diagnóstico molecular con la calidad analítica requerida por las Normas Internacionales de validación de ensayos NAT y la Regulación 47/ 2007 del CECMED, es por ello que esta institución le concedió el registro al UMELOSA® HCV CUALITATIVO en junio de 2002 (No. Registro: D0206-18C, Cuba) y al UMELOSA® VHC CUANTITATIVO en febrero de 2010 (No. Registro: D1002-10, Cuba) (ANEXO 11).

Es importante señalar que, dada la problemática de la infección del VHC en Cuba y el hecho de que nuestro país está en vías de desarrollo, quizás debemos replantearnos algunos cambios en nuestros propios algoritmos para la pesquisa y el seguimiento del VHC: La primera consideración es con respecto a la pobre interpretación de los resultados del ensayo serológico UMELISA HCV, pues actualmente los resultados se reportan en Reactivo o No Reactivo, cuando en realidad este es un ensayo semi-cuantitativo donde, en dependencia de los valores de relación de sus resultados, puede definirse si es necesario o no realizar un ensayo de detección molecular, mucho más costoso. Otra consideración es con respecto a la poca información sobre técnicas analíticas para la detección del VHC que tienen muchos médicos, incluso gastroenterólogos, pues al evaluar un paciente crónico, que nunca ha recibido tratamiento o no respondedor al mismo, cada vez que se cita a consulta le orientan la realización de una prueba de detección del ARN viral, cuando se conoce que en la etapa de cronicidad no se produce remisión espontánea de la enfermedad, esto solo ocurre en la fase aguda de la misma (Ghany, 2009).

Por otro lado, tenemos aquellos casos en los que el paciente lleva más de cinco años después de terminado el tratamiento con una adecuada RVS y los médicos mantienen la indicación de hacer diagnóstico viral porque detectan el anti-VHC positivo en el paciente (Padrón *et al.*, 1995b). Se plantea que la respuesta de anticuerpos puede permanecer detectable hasta 20 años o más (Ghany, 2009), pues los llamados anticuerpos IgG, de "memoria inmunológica", aunque reduzcan sus concentraciones en sangre, es muy poco probable que no sean detectados por un ELISA de tercera generación (tienen sensibilidad de 98-100 %), lo cual no significa

que exista virus en fase replicativa en el paciente. En dichos casos también es posible utilizar los datos semicuantitativos del UMEELISA HCV, porque el valor de relación que se obtiene para los anticuerpos de memoria, a pesar de estar por encima del nivel de corte del ensayo, es un valor relativamente bajo (relación entre 0,3 y 0,8) con respecto a los que se obtienen cuando existe replicación viral activa, que generalmente son muy elevados (relación > 0,8), con excepción de los pacientes inmunocomprometidos.

Lo anterior nos permite proponer un nuevo algoritmo de pesquisa del VHC, el cual se muestra en el ANEXO 9. El algoritmo está basado en la respuesta de anticuerpos anti-VHC, obtenidas por el ensayo UMEELISA HCV. Si una persona es repetidamente seropositiva al anti-VHC y su Relación (Fm-B)/ (P-B) es mayor que 0,8 (Fm: Fluorescencia de la muestra; B: Fluorescencia del blanco; P: Fluorescencia del positivo), es muy probable que se encuentre en una etapa aguda avanzada o en la etapa crónica de la infección donde la correlación de los resultados con el ARN viral son de 100%; sin embargo si esta Relación es menor que 0,8, la persona puede estar en la fase de seroconversión, en la etapa aguda inicial o ser un falso positivo de la prueba de anticuerpos y por ello es imprescindible realizar un estudio de ARN viral para confirmar la presencia o no del VHC. Este algoritmo nos va a permitir utilizar con más eficiencia, las herramientas diagnósticas que tenemos.

Una vez que se comprobó que los ensayos UMELOSA® HCV CUALITATIVO y UMELOSA® VHC CUANTITATIVO eran herramientas útiles para el diagnóstico y monitoreo de la carga viral durante el tratamiento, nos dimos a la tarea de probar sus aplicaciones. ANEXO 12.

En 2004, el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública decidió confirmar la presencia del ARN del VHC por el ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO a los siguientes grupos: 1) niños con hepatitis C; 2) pacientes de trasplante hepático y/o renal; 3) pacientes de servicios de hemodiálisis y 4) personas con hepatitis crónica C detectadas en los bancos de sangre.

A finales de 2005 se introdujo el UMELOSA® HCV CUALITATIVO en el Sistema de Salud Cubano (Hospital Hermanos Ameijeiras e Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí). Esto ha permitido la confirmación y el seguimiento de la terapia en niños con hepatitis C crónica, la evaluación de todos los servicios de hemodiálisis del país y de los pacientes y donantes del Programa Nacional de Trasplante (córnea, médula, corazón, hígado y riñón): Las cifras de determinaciones realizadas y de positivos detectados se muestran en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Determinaciones realizadas desde 2006 al primer semestre de 2013 y porcentaje de positividad

Año	Muestras evaluadas	Positivas	Porcentaje de positividad
2006	1 054	613	58,16 %
2007	1 143	609	53,28 %
2008	1 333	837	62,79 %
2009	580	414	71,38 %
2010	910	374	41,10 %
2011	1 643	334	20,33 %
2012	1 479	564	38,13 %
1 ^{er} semestre/ 2013	479	129	26,93 %
TOTAL	8 621	3 874	44,94 %

El UMELOSA® HCV CUALITATIVO también ha estado disponible en varios protocolos de ensayos clínicos y en otros estudios realizados:

- **2002–2013:** Apoyo al Programa de trasplante hepático y renal del CIMEQ mediante confirmación diagnóstica de seropositivos al anti-VHC, evaluación de pacientes en tratamiento con antivirales, de pacientes pendientes de trasplante y donantes y de pacientes con trasplante hepático o renal.

- **2003:** Estudio de la tasa real de positivos en banco de sangre mediante el UMELISA HCV para la pesquisa de los seropositivos a anticuerpos y el UMELOSA® HCV CUALITATIVO como prueba confirmatoria.

- **2004–2006:** Evaluación mediante UMELOSA® HCV CUALITATIVO de tres protocolos de ensayos clínicos con extensión nacional:

“Empleo de la terapia combinada de interferón alfa 2b recombinante y ribavirina como primer tratamiento de la lesión hepática crónica por el virus de la hepatitis C” (CIGB).

“Terapia de inducción con interferón alfa 2b recombinante asociado a ribavirina en pacientes con hepatitis crónica C, contra grupo control tratado con esquema tradicional de empleo de interferón alfa 2b recombinante asociado a ribavirina” (IGE).

“Empleo de triple terapia en pacientes con hepatitis C crónica con interferón alfa 2b recombinante, ribavirina y Viusid, contra grupo control tratado con interferón alfa 2b recombinante y ribavirina” (IGE).

- **2011–2013:** Evaluación mediante UMELOSA® HCV CUALITATIVO del ensayo clínico de fase II “Evaluación de la seguridad y farmacodinámica de Terap C: una preparación vacunal de uso terapéutico en el tratamiento de la hepatitis crónica por el VHC. Ensayo controlado, aleatorizado, con cegamiento”. (CIGB-IGE).

- **2013:** Estudio de seroprevalencia del VHC en servicio de hemodiálisis de La Habana y Artemisa (CIGB).

En 2009 se realizaron dos evaluaciones externas del ensayo UMELOSA VHC CUANTITATIVO en el Laboratorio de Referencia de las Hepatitis virales del IPK con resultados muy satisfactorios. (ANEXO 13)

Con este trabajo se demuestra la importante repercusión que tiene la aplicación de estas novedosas técnicas diagnósticas en nuestro país, en la indicación de terapia y el seguimiento de pacientes en tratamiento, así como su efecto en la disminución de la prevalencia del VHC en nuestra población.

CONCLUSIONES

1. La estandarización del procedimiento de extracción del ARN del VHC, permitió disminuir los volúmenes de muestras/reactivos y el tiempo de ensayo, así como reformular el tampón de lisis con un ARN heterólogo que posibilita la co-precipitación del ARN viral y el aumento de su estabilidad a 4 °C, con implicaciones positivas para el aislamiento del genoma viral con la calidad requerida para su posterior amplificación. La introducción del Estándar interno en el tampón de lisis garantiza la cuantificación absoluta del ARN del VHC y la robustez del ensayo cuantitativo.
2. La estandarización de la amplificación del ARN viral del ensayo cualitativo, permitió optimizar las condiciones de la RT-PCR y la PCR anidada y la introducción de un cebador propio permitió incrementar significativamente la sensibilidad y especificidad genotípica del ensayo. Por otra parte, la introducción de los cebadores propios para la RT-PCR competitiva, permite amplificar el ARN viral y el estándar interno en un solo paso, lo que posibilita la cuantificación del ARN del VHC y por ende, el monitoreo de la terapia.
3. El diseño propio de las sondas de captura, la selección de las concentraciones óptimas de trabajo y el establecimiento de las condiciones de recubrimiento, permitieron la estandarización de la etapa de detección de los ensayos cualitativo y cuantitativo mediante la tecnología SUMA, lo que las hace técnicas factibles de ser introducidas en la Red Nacional de Salud.
4. El ensayo UMELOSA® HCV CUALITATIVO desarrollado puede ser usado con suero o plasma humano, exhibe buena especificidad clínica, analítica y genotípica. Además, la prueba muestra un adecuado límite de detección, robustez y concordancia con el *AMPLICOR® HCV Test*, por lo que cumple con los requerimientos de sensibilidad y especificidad para ser usado como prueba confirmatoria, en el seguimiento terapéutico y para la pesquisa de mezclas de plasma para hemoderivados.
5. El ensayo desarrollado UMELOSA® VHC CUANTITATIVO presenta una buena especificidad clínica, analítica y genotípica, buena reproducibilidad, robustez, rango lineal de cuantificación, límite de detección y concordancia con el *AMPLICOR HCV MONITOR® Test*, lo que permite que el ensayo pueda ser utilizado para el seguimiento terapéutico de pacientes bajo tratamiento.
6. Dadas las ventajas de la Tecnología SUMA y el costo de los ensayos desarrollados, UMELOSA® HCV CUALITATIVO y UMELOSA® VHC CUANTITATIVO, es económicamente factible producir los mismos, de forma estable y sostenible, lo cual implica un considerable ahorro de divisas para nuestro país.

RECOMENDACIONES

1. Estandarizar un ensayo cualitativo basado en un solo paso de RT-PCR y que contenga un estándar interno para detectar los falsos negativos por inhibición.
2. Diseñar nuevas sondas de detección que sean complementarias a las secuencias de los productos amplificados y que no se bloqueen mutuamente, con el objetivo de aumentar la detectabilidad de los ensayos.
3. Evaluar muestras positivas al VHC de los genotipos 4 y 5 con concentraciones dentro del rango lineal de la curva de cuantificación del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO, con el objetivo de evaluar la exactitud de su cuantificación.

BIBLIOGRAFÍA

Albeldawi M, Ruiz-Rodríguez E y Carey WD. Hepatitis C virus: Prevention, screening and interpretation of assay. *Cleveland Clin. J. Med.* 2010; 77(9): 616-626.

Alter MJ, Kruzon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N. Engl. J. Med.* 1999; 341: 556-62.

Ansaldi F, Torre F, Bruzzone BM, et al. Evaluation of a new Hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. *J. Med. Virol.* 2001; 63: 17-21.

Anuario Estadístico de Salud 2012. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Ministerio de Salud Pública. ISSN: 1561-4425. La Habana, Cuba, 2013.

Arghavani MB y Romano LJ. A method for the purification of oligonucleotides containing strong intra- or intermolecular interactions by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 1995; 231(1): 201-209.

Aslanzadeh J. Preventing PCR amplification carryover contamination in a clinical laboratory. *Annals Clin. Lab. Sci.* 2004; 34(4): 389-396.

Ballester JM, Rivero RA, Villaescusa R, et al. Hepatitis C virus antibodies and other markers of blood-transfusion-transmitted infection in multi-transfused Cuban patients. *J. Clin. Virol.* 2005; 34(2): S39-S46.

Barba JR. La hepatitis C y el laboratorio clínico. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 2008; 5(4): 187-200.

Bartlett JM y Stirling D. Short history of the PCR. *Methods Mol. Biol.* 2003; 226: 3-6.

Baylis S, Davis C, Holmes H, et al. Reporte del International Working Group on the Standardisation of Genome Amplification Techniques (SoGAT) for the Safety Testing of Blood, Tissues and Organs for Blood Borne Pathogens. NIBSC, Washington, EE.UU., 2005.

Beaucage SL y Caruthers MH. Studies on nucleotide Chemistry V. Deoxynucleoside phosphoramidites- a new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981; 22: 1859-1863.

Belák S. Molecular diagnosis of viral diseases, present trends and future aspects. A view from the OIE collaborating centre for the application of polymerase chain reaction methods for diagnosis of viral diseases in veterinary medicine. *Vaccine* 2007; 25: 5444-5452.

Beld M, Minnaar R, Weel J, et al. Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(7): 3059-3064.

González González, YJ

Bello M, Rodríguez LA, Gutiérrez A, et al. Detección de marcadores de hepatitis B y hepatitis C en pacientes VIH positivos, 2000-2004. *Rev. Cub. Med. Trop.* 2005; 57(3): 112-113.

Bello M, González I, Rodríguez LA, et al. Marcadores virales de las hepatitis B y C en niños con VIH. *Rev. Enferm. Infecc. en Ped.* 2010; 23(91): 80-86.

Berger A, Scherzed L, Stürmer M, et al. Comparative evaluation of the Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test, the new Cobas AmpliPrep/Cobas Amplicor HIV-1 Monitor Ultrasensitive Test and the Versant HIV RNA 3.0 assays for quantitation of HIV-1 RNA in plasma samples. *J. Clin. Virol.* 2005; 33: 43-51.

Blackard JT y Sherman KE. Hepatitis C Virus infection and superinfection. *J. Infect. Dis.* 2007; 195: 519-24.

Blight K, Lesniewski RR, LaBrooy JT, et al. Detection and distribution of hepatitis C-specific antigens in naturally infected liver. *Hepatology* 1994; 20: 553-557.

Bouchardeau F, Chauveau P, Le Marrec N, et al. Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction in haemodialysed patients in relationship to anti-HCV status. *Res. Virol.* 1993; 144: 233-242.

Boulestin A, Sandres-Saune K, Payen JL, et al. Genetic heterogeneity of the envelope 2 gene and eradication of hepatitis C virus after a second course of interferon-alpha. *J. Med. Virol.* 2002; 68(2): 221-228.

Bouvier AM, Patel K, Dahari H, et al. Clinical utility of total HCV core antigen quantification, a new indirect marker of HCV replication. *Hepatology* 2002; 36: 211-218.

Bowden DS y Berzsenyi MD. Chronic hepatitis C virus infection: genotyping and its clinical role. *Future Microbiol.* 2006; 1: 103-12.

Brass V, Moradpour D y Blum HE. Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): update. *Int. J. Med. Sci.* 2006; 3(2): 29-34.

Brownie J, Shawcross S, Theaker J, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucl. Acids. Res.* 1997; 25: 3235-3241.

Bruno S y Facciotto C. The natural course of HCV infection and the need for treatment. *Ann. Hepatol.* 2008; 7(2): 114-119.

Bukh J, Miller RH y Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin. Liver Dis.* 1995; 15(1): 41-63.

Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, et al. Standardization of data from real-time quantitative PCR methods - evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.* 2005, 5, 31-44.

- Buti M y Homs M.** Nuevos agentes para el tratamiento de la hepatitis C. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 2012; 30(3): 147–150.
- Cabezas-Fernández MT y Cabeza-Barrera MI.** Introduction of automated system for the diagnosis and quantification of hepatitis B and hepatitis C viruses. *The Open Virol. J.* 2012; 6(Suppl 1:M4): 122-134.
- Caliendo AM, Valsamakis A, Zhou Y, et al.** Multilaboratory Comparison of Hepatitis C Virus Viral Load Assays. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(5): 1726–1732.
- Capote LL, Morejón E, Mora S, et al.** Factores de riesgo para la transmisión de la hepatitis C en hemodiálisis. *Rev. Cubana Med.* 2005; 44(3-4).
- Carithers RL Jr, Marquardt A y Gretch DR.** Diagnostic Testing for Hepatitis C. *Semin. Liver Dis.* 2000; 20: 159-171.
- Chen M, Sonnerborg A y Sallberg M.** Levels of hepatitis C virus (HCV) RNA in serum and their relationship to levels of immunoglobulin M and G antibodies against HCV core protein. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33(3): 778-780.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, et al.** Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31: 3497-3500.
- Chevaliez S y Pawlotsky JM.** *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology.* Editorial Tan SL, Horizon Bioscience, Norfolk, Reino Unido, 2006.
- Chirgwin JM, Przybyla AE, MacDonald RJ, et al.** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 1979; 18: 5294-5299.
- Chomczynski P.** A reagent for the single-step simultaneous isolation for RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993; 15: 532–535.
- Chomczynski P y Sacchi N.** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162(1): 156-159.
- Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al.** Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244(4902): 359-362.
- Choo QL, Richman KH, Han JH, et al.** Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1991; 88(6): 2451-2455.

- Chu CM, Yeh CT y Liaw YF.** Fulminant hepatic failure in acute hepatitis C: increased risk in chronic carriers of hepatitis B virus. *Gut* 1999; 45(4): 613-617.
- Coleman WB y Tsongalis GJ.** *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratory.* Editorial Humana Press. ISBN 1-58829-356-4, 2006: 47-56 y 65-74.
- Comanor L, Anderson F, Ghany M, et al.** Transcription-mediated amplification is more sensitive than conventional PCR-based assays for detecting residual serum HCV RNA at end of treatment. Detection of residual HCV RNA by TMA-Based Assay. *The Amer. J. Gastroenterol.* 2001; 96: 2968-2972.
- Council of Europe Guidelines** for validation of nucleic acid amplification technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in plasma pools. Strasbourg. PA/PH/OMCL 1999; 98: 22.
- Courouce AM, Le Marrec N, Bouchardeau F, et al.** Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period. *Transfusion* 2000; 40: 1198-1202.
- Cura E y Wendel S.** *Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de Bancos de Sangre.* Editorial Organización Panamericana de la Salud. Washington DC., EE.UU., 1994.
- Dal Molin G, Dágaro P, Ansaldi F, et al.** Mother to infant transmission of hepatitis C virus: Rate of infection and assessment of viral load and IgM anti-HCV as risk factors. *J. Med. Virol.* 2002; 67(2): 137-142.
- Davis G.** Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36 (suppl1):S145-151.
- Deforges S, Evlashev A, Perret M, et al.** Expression of hepatitis C virus proteins in epithelial intestinal cells in vivo. *J. Gen.Virol.* 2004; 85: 2515-2523.
- Del Campo JA y Romero-Gomez M.** Steatosis and insulin resistance in hepatitis C: a way out for the virus? *World J.Gastroenterol.* 2009; 15(40): 5014-5019.
- Delahooke TE .** Hepatitis C: What is the nature of the problem? *J. Viral Hepat.* 2004; 11 Suppl 1: 5-11.
- Desombere I, Van Vlierberghe H, Couvent S, et al.** Comparison of Qualitative (Cobas Amplicor HCV 2.0 vs VERSANT HCV ARN) and Quantitative (Cobas Amplicor HCV Monitor 2.0 vs VERSANT HCV ARN 3.0). Assays for Hepatitis C virus RNA detection and quantification: Impact on diagnosis and Treatment of HCV infections. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6): 2590-2597.
- Detmer J, Lagier R, Flynn J, et al.** Accurate quantification of hepatitis C virus (HCV) RNA from all HCV genotypes by using branched-DNA technology. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 901-907.

Dienstag JL y McHutchison JG. American Gastroenterological Association medical position statement on the management of hepatitis C. *Gastroenterology* 2006; 130: 225-230.

Di Martino V, Richou C, Cervoni JP, et al. Response-guided peg-interferon plus ribavirin treatment duration in chronic hepatitis C: meta-analyses of randomized, controlled trials and implications for the future. *Hepatology* 2011; 54: 789.

Doyle K. *Protocols and Applications Guide Tercera Edición.* Editorial Promega Corporation, Madison, EE.UU., 1996.

Drexler JF, Kupfer B, Petersen N, et al. A Novel Diagnostic Target in the Hepatitis C Virus Genome. *PLoS Med* 2009; 6(2): e1000031.

Duarte C, Guillén GE, Álvarez A, et al. System for the expression of heterologous antigens as fusion protein. Patente EP0816506A1, 1998.

Dumont S, Cheng W, Serebrov V, et al. RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. *Nature* 2006; 439: 105-108.

Einav S, Elazar M, Danieli T, et al. A nucleotide binding motif in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates HCV RNA replication. *J. Virol.* 2004; 78: 11288-11295.

EMA (European Medicines Agency). **Incivo telaprevir.** Assessment report London: EMA. 19/03/2012a [Citado 20.06.2012]. Incivo -EMA/H/C/002313 -II/0002. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/enGB/document_library/EPAR_Public_assessment_report/human/002313/WC500115532.pdf. Archivado por WebCite® en: <http://www.webcitation.org/65INKY9Xf>.

EMA. **Victrelis boceprevir.** ANEXO I. Ficha técnica o resumen de las características del producto. London: EMA. 21/03/2012b [Citado 20.06.2012]. Victrelis -EMA/H/C/002332 -II/0004. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/es_ES/document_library/EPAR__Product_Information/human/002332/WC500109786.pdf. Archivado por WebCite® en: <http://www.webcitation.org/65IIHzq8m>.

EMBL Nucleotide Sequence Database. Heidelberg, Alemania. [citado 18.09.2000]. Disponible en: <http://www.embl-heidelberg.de>.

Erali M, Ashwood ER y Hillyard DR. Performance Characteristics of the COBAS AMPLICOR Hepatitis C Virus MONITOR Test, v 2.0. *Am. J. Clin. Pathol.* 2000; 114: 180-187.

ECCLS, European Committee for Clinical Laboratory Standards y EDQM, European Directorate for the Quality of Medicines. Guidelines of validation to qualitative assay. 1999.

Farci PH, Alter J, Shimoda A, *et al.* Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. N. Engl. J. Med. 1996; 335(9): 631-634.

FDA, Food and Drug Administration. Guidance for Industry. Quality Systems Approach to Pharmaceutical Current Good Manufacturing Practice Regulations. Maryland, EE.UU., 2006. [citado: 14.08.2013]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070337.pdf>.

FDA, Guidance for Industry. Use of Nucleic Acid Tests on pooled and individual samples from donors of whole blood and blood components, including source plasma, to reduce the risk of transmission of HCV. U.S. Department of Health and Human Services. Center for Biologics Evaluation and Research, draft guidance. Maryland, EE.UU., 2011.

FDA, US Department of Health and Human Services. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Audiencia pública: Expanded access to direct-acting antiviral agents for the treatment of chronic hepatitis C infection in patients with unmet medical need. 2010. [citado: 30.08.2013]. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/NewsEvents/UCM213444.pdf>.

Finney DJ. Probit analysis; parallel line analysis. Tercera edición. Editorial Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido, 1971.

Forton DM, Thomas HC y Taylor-Robinson SD. Central nervous system involvement in hepatitis C virus infection. Metab. Brain. Dis. 2004; 19: 383-391.

Freeman WM, Walker SJ y Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. BioTechniques 1999; 26: 112-22.

Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, *et al.* Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N. Engl. J. Med. 2002; 347: 975-982.

Fryer JF y Minor PD. Standardisation of nucleic acid amplification assays used in clinical diagnostics: A report of the first meeting of the SoGAT Clinical Diagnostics Working Group. J. Clin. Virol. 2009; 44: 103-105.

- Furione MS, Simoncini L, Gatti M, et al.** HCV genotyping by three methods: Analysis of discordant results based on sequencing. *J. Clin. Virol.* 1999; 13(3): 121-130.
- Ge D, Fellay J, Thompson AJ, et al.** Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461: 399–401.
- GenBank.** HCV sequence database. Los Alamos, National Laboratory. 2009. [citado: 01.08.2013]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, et al.** Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: An update. *Hepatology* 2009; 49(4): 1335-1374.
- Ghany MG, Nelson DR, Strader DB, et al.** An update on treatment of genotype 1 chronic hepatitis C virus infection: 2011 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; 54(4): 1433-1444.
- Goldratt E.** La meta. Cuarta edición. Editorial North River Press, Massachussets, EE.UU., 1990.
- Gonzalez-Candelas F, Lopez-Labrador FX y Bracho MA.** Recombination in hepatitis C virus. *Viruses* 2011; 3(10): 2006-2024.
- González-Horta EE, Marante J, Amador-Cañizares Y, et al.** Analysis of hepatitis C virus core encoding sequences in chronically infected patients reveals mutability, predominance, genetic history and potential impact on therapy of Cuban genotype 1b isolates. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2011; 15(11):1320-7.
- Gorrin G, Friesenhahn M, Lin P, et al.** Performance Evaluation of the Versant HCV RNA Qualitative Assay by using Transcription-Mediated Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(1), 310-317.
- Gretch D.** Diagnostic tests for hepatitis C virus. *Hepatology* 1997; 26: 43S-47S.
- Griffin SD, Beales LP, Clarke DS, et al.** The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 2003; 535(1): 34-38.
- Guann-Yi Y, Lee K-J, Gao L, et al.** Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein. *J. Virol.* 2006; 80(12): 6013–6023.
- Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al.** Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for Chronic Hepatitis C: randomized study of the effect of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140: 346-355.

- Hajarizadeh B; Grebely J y Dore GJ.** Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2013; 10(9): 553-562.
- Hasan NS, Abdel-Rasheed E, Fahmy H, et al.** Comparison between the Results of the Real Time PCR Test and Those of the Cobas Amplicor HCV Test, v 2.0. In *Hepatitis C Virus Infected Egyptian Patients.* *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 2012; 6(3): 489-495.
- Hayden RT, Yan X, Wick MT, et al.** Factors Contributing to Variability of Quantitative Viral PCR Results in Proficiency Testing Samples: a Multivariate Analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 50(2): 337-345.
- Hendricks DA, Friesenhahn M, Tanimoto L, et al.** Multicenter evaluation of the VERSANT HCV RNA qualitative assay for detection of hepatitis C virus RNA. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 651-6.
- Hofmann WP, Dries V, Herrmann E, et al.** Comparison of transcription mediated amplification (TMA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) for detection of hepatitis C virus RNA in liver tissue. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 289-93.
- Holodniy M, Kim S, Katzenstein M, et al.** Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparine. *J. Clin. Microbiol.* 1991; 29:676-679.
- Hoofnagle JH.** Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: 21-29.
- Huarte MP y Casi MA.** Virología, pruebas diagnósticas, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHC. *Anales Sis. San Navarra* 2004; 27(2): 41-50.
- Institute Paul Ehrlich.** The PEI requirements for the validation and routine operation of the HCV-NAT in the blood collection service. Page 2, section 2. Alemania, 2003. [citado: 3.08.2013]. Disponible en: <http://www.pei.de/english/validengl.pdf>
- Instructivo del estuche *Amplicor HCV Test, v 2.0.*** Roche Molecular Systems, Pleasanton, California, EE. UU., 2001.
- Instructivo del estuche *Amplicor HCV Monitor Test, v 2.0.*** Roche Molecular Systems, Pleasanton, CA, EE. UU., 2004.
- Instructivo del estuche *pGEM-T Vector System.*** Promega, Madison, WI, EE. UU., 2003.
- Instructivo del estuche *Riboprobe® in vitro Transcription Systems.*** Promega, Madison, WI, EE. UU., 2005.
- Instructivo del estuche UMELISA HCV.** Edición 2. TecnoSUMA, Cuba, 2011.

- Instructivo del estuche UMELOSA HCV CUALITATIVO. Edición 2. TecnoSUMA, Cuba, 2012.
- Instructivo del estuche *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification S*. Promega, Madison, WI, EE. UU., 2005.
- Instructivo del estuche *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*. Promega, Madison, WI, EE. UU., 2004.
- Instructivo del panel *Pelicheck HCV-RNA sensitivity panel* (Nº de catálogo S2004). Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Blood Transfusion Service. 2002.
- Instructivo para el uso del *NIBSC HCV RNA Working Reagent for NAT*. Código: 98/576. NIBSC. 2002.
- Kamili S, Drobeniuc J, Araujo AC, *et al*. Laboratory Diagnostics for HCV Infection. Clin. Infect. Dis. 2012; 55(S1): S43-S48.
- Katcher HL y Schwartz I. A distinctive property of Tth DNA polymerase: Enzymatic amplification in the presence of phenol. Bio. Techniq. 1994; 16: 84-92.
- Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. Acta Med. Okayama 2001; 55(3): 133-159.
- Kim Y, Vaughan K, Greenbaum J, *et al*. A meta-analysis of the existing knowledge of immunoreactivity against hepatitis C virus (HCV). PLoS One. 2012; 7(5): e38028.
- Kleiboeker SB. Applications of competitor RNA in diagnostic reverse transcription-PCR. J. Clin. Microbiol. 2003; 414: 2055–2061.
- Kontanis EJ y Reed FA. Evaluation of real-time PCR amplification efficiencies to detect PCR inhibitors. J. Forensic. Sci. Int. 2006; 51: 795-804.
- Kraj B y Nadder T. Blood donor screening process and infectious disease testing using molecular methods. Advance Med. Lab. Professional 2007; 19(21): 17.
- Latt N, Alachkar N y Gurakar A. Hepatitis C virus and its renal manifestations: a review and update. Gastroenterol. Hepatol. 2012; 8(7): 434-445.
- Le Guillou-Guillemette H y Lunel-Fabiani F. Detection and quantification of serum or plasma HCV RNA: mini review of commercially available assays. Methods Mol. Biol. 2009; 510: 3-14.
- Lee S, Antony A, Lee N *et al*. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR test for hepatitis C virus RNA: Calibration to international units, enhanced genotype reactivity, and performance characteristics. J. Clin. Microbiol. 2000; 38: 4171-4179.
- Lefrere JJ, Guiramand S, Lefrere F, *et al*. Full or partial sero-reversion in patients infected by hepatitis C virus. J. Infect. Dis. 1997; 175:316-322.
- González González, YJ**

- Lehninger AL.** Principles of Biochemistry. Quinta edición. Editorial WH. Freeman Publishers, Hamburgo, Alemania, 2009.
- Lemon SM, Walker C, Alter MJ, et al.** Hepatitis C virus. En Knipe DM, Howley PM, editores. Fields Virology, quinta edición. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. Filadelfia, EE. UU., 2007: 1259-1261.
- Liegler TJ y Grant RM.** Nucleic Acid-Based HIV-1 Viral Load Assays HIV. InSite Knowledge Base Chapter
- Logvinoff C, Major ME, Oldach D, et al.** Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004; 101(27): 10149-10154.
- Lok AS, Gardiner DF, Lawitz E, et al.** Preliminary Study of Two Antiviral Agents for Hepatitis C Genotype 1. N. Engl. J. Med. 2012; 366: 216-24.
- Lok AS y Pawlotsky JM.** Viral hepatitis at a crossroad. Gastroenterology 2012; 142: 1261-1263.
- Longo MC, Berninger MS y Hartley JL.** Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in PCR. Gene 1990; 93: 125-128.
- Lopez-Suñé E, Montse T, Montse L et al.** Características de los fármacos anti-víricos activos frente al virus de la hepatitis y el virus de la influenza: actualización 2009. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 2010; 28(4): 253.e1–253.e17.
- Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al.** Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of Chronic Hepatitis C: a randomised trial. Lancet 2001; 358: 958-965.
- Márquez-Rosales MG, Santoscoy-Tovar FA y Montoya-Fuentes H.** Frecuencia y distribución de genotipos del virus de la hepatitis C en población mexicana seleccionada. Rev. Mex. Patol. Clin. 2008; 55(2): 79-87.
- Martínez Campos JF, Pérez Rodríguez A, Montalvo Villalba MC, et al.** Seroprevalencia y factores asociados a la hepatitis C en los municipios Playa y Mariano. Rev. Panam. Infectol. 2005; 7(3): 8-14.
- Martins PP, Lampe E, Lewis-Ximenez LL, et al.** Performance of molecular methods for hepatitis C virus diagnosis: usefulness among chronic cases and during the course of infection. Clin. Lab. 2013; 59: XXX–XXX.
- Mauss S, Berg T, Rockstroh J et al.** Hepatology 2012. A clinical textbook. Tercera edición. Editorial Flying Publisher, Alemania, 2012.
- McCormick M.** Pellet Paint: a visible nucleic acid carrier for efficient, error-free precipitation. Innovat. 1995; 4: 10-11.

- McKenna SA, Kim I, Viani E, et al.** Purification and characterization of transcribed RNAs using gel filtration chromatography. *Nature Protocols* 2007; 2: 3270-3277.
- Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, et al.** Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic. Acids. Res.* 1984; 12(18): 7035-7056.
- Mohd HK, Groeger J, Flaxman AD, et al.** Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection: New Estimates of Age-Specific Antibody to HCV Seroprevalence. *Hepatology* 2013; 57: 1333-1342.
- Mondelli M.** Monitoring response to antiviral treatment by serum hepatitis C virus core antigen: too early to take shortcuts? *J. Hepatol.* 2004; 40: 536-538.
- Montgomery DC.** Design and Analysis of Experiments. Editorial John Wiley, Nueva York, EE. UU., 1991.
- Morales-Grillo J, Viña-Rodríguez A, Barro MI, et al.** Secuencias de ADNc derivadas del genoma del virus de la hepatitis C y su uso. Patente CU 22642 A1. 2000.
- Morishima C, Chung M, Ng KW, et al.** Strengths and limitations of commercial tests for hepatitis C virus RNA quantification. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 421-5.
- Moss T.** DNA-protein Interactions: principles and protocols. (Methods in molecular biology; v. 148). 2da edición. Editorial: Human Press. Towa, Nueva Jersey, EE.UU., 2001.
- Mulder J, McKinney N, Christopherson C, et al.** Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 292-300.
- Muller Z, Stelzl E, Bozic M, et al.** Evaluation of automated sample preparation and quantitative PCR LCx assay for determination of HIV 1 RNA. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 1439-1443.
- Mullis KB.** The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Scientific Am.* 1990; 262 (4): 56-61.
- Munakata T, Nakamura M, Liang Y, et al.** Down-regulation of the retinoblastoma tumor suppressor by the HCV NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005; 102: 18159-18164.
- Muñoz G.** Diagnóstico serológico y virológico de la hepatitis C y B: Aspectos prácticos. *Gastr. Latinoam.* 2006; 17(2): 249-252.

- Nolte FS, Fried MW, Shiffman ML, et al.** Prospective multicenter clinical evaluation of AMPLICOR and COBAS AMPLICOR hepatitis C virus tests. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 4005-4012.
- Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, et al.** Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on the analysis of 5'noncoding region. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 1558-1564.
- Okamoto H, Okada S, Sugiyama Y, 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. *Jap. J. Exp. Med.* 1990; 60: 215-222.
- OMS, Organización Mundial de la Salud.** Expert Committee on Biological Standardization. WHO Working Group on Hepatitis and HIV Diagnostic Kits. 2003.
- OMS, Organización Mundial de la Salud.** Hepatitis C. Global Alert and Response. 2012. [citado 10 de junio de 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsrlyo2012/en/index2.html>.
- Padrón G, Roca J, Jameel S, et al.** The hepatitis C virus infection in Cuba: Antibody pattern and genotypes. *Biotec. Aplic.* 1995a; 12: 93-94.
- Padrón GJ.** Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales. Editorial Elfos Scientiae, La Habana, Cuba, 1998: 161-184.
- Padrón GJ, Arús E, Rivera L, et al.** The hepatitis C virus infection in Cuba: prevalence, antibody and risk factors. *Biotec. Aplic.* 1995b; 12(2): 94-95.
- Pasloske BL, WalkerPeach CR, Obermoeller RD et al.** Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 3590-3594.
- Pasloske BL y Wu W.** Method and reagents for inactivating ribonucleases RNase A, RNase I and RNase T1. US Patent N° 09160284, 1998.
- Pawlotsky JM.** Diagnostic testing in hepatitis C virus infection: viral kinetics and genomics. *Semin. Liver Dis.* 2003a; 23 (Suppl.1): 3-11.
- Pawlotsky JM.** Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002a;122:1554-8.
- Pawlotsky JM.** New antiviral agents for hepatitis C. *F1000. Biol. Rep.* 2012; 4: 5.
- Pawlotsky JM.** Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin. Liver Dis.* 2003b; 7:127-37.
- Pawlotsky JM.** Use and interpretation of virological tests for HCV. *Hepatology* 2002b; 36(5): S65-73.

- Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, et al.** Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology* 2000; 32: 654-659.
- Pawlotsky JM, Maisonneuve D, Duval J, et al.** Significance of NS5 "indeterminate" third-generation anti-hepatitis C virus serological assays. *Transfusion* 1995; 35: 453-454.
- Pawlotsky JM, Martinot-Peignoux M, Poveda JD, et al.** Quantification of hepatitis C virus RNA in serum by branched DNA-based signal amplification assays. *J. Virol. Methods.* 1999; 79: 227-35.
- Penin F, Brass V, Appel N, et al.** Structure and function of the membrane anchor domain of hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(39): 40835-40843.
- Piatak MJr, Luk KC, Williams B, et al.** Quantitative Competitive Polymerase Chain Reaction for Accurate Quantitation of HIV DNA and RNA Species. *BioTechniques* 1993; 14(1): 70-81.
- Poordad F, Lawitz E, Kowdley KV, et al.** Exploratory Study of Oral Combination Antiviral Therapy for Hepatitis C. *N. Engl. J. Med.* 2013; 368: 45-53.
- Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, et al.** Viral hepatitis C. *The Lancet* 2003; 362: 2095-2100.
- Pyne MT, Konnick EQ, Phansalkar A et al.** Evaluation of the Abbott investigational use only Realtime Hepatitis C virus (HCV) assay and comparison to the Roche TaqMan HCV analyte-specific reagent assay. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(9): 2872-2878.
- Quintana MG y Apezteguía I.** The Good Practices in the production of biological agents and the Quality Management Systems. *Rev. Cubana Farm.* 2010; 44: 4.
- Radkoski M, Gallegos-Orozco JE, Jablonska J, et al.** Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology* 2005; 41: 106-14.
- Radstrom P, Knutsson R y Wolffs P.** Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26: 133-46.
- Rallon N, Naggie S, Benito J, et al.** Strong Association of a Single Nucleotide Polymorphism Located Near the Interleukin-28b Gene with Response to Hepatitis C Therapy in HIV/HCV Co-infected Patients. 17th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. San Francisco, CA. Febrero, 2009. Abstract 165LB.
- Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, et al.** Genetic Variation in IL28B Is Associated with Chronic Hepatitis C and Treatment Failure: A Genome-wide Association Study. *Gastroenterology* 2010; 138(4): 1338-1345.

- Reddy AK, Dakshinamurthy KV y Lakshmi V.** Utility of HCV core antigen ELISA in the screening for Hepatitis C Virus Infection in patients on hemodialysis. *Indian J. Med. Microbiol.* 2006; 24(1): 55-57.
- Reed G.** Generating appropriate technologies for health equity: José Luis Fernández Yero. *MEDICC Review* 2009; 11(1): 14-17.
- Regulación No. 47-2007:** Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos. CECMED, 2007.
- Rehermann B y Nascimbeni M.** Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2005; 5(3): 215-229.
- Rio DC, Ares MJ, Hannon GJ, et al.** RNA: A Laboratory Manual. Editorial CSHL Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2010.
- Rivero RA.** Antecedentes, diagnóstico y estudio evolutivo de la hepatitis C y la hemofilia. *Rev. Cub. Hematol. Inmunol. Med. Transf.* 2009; 25(1): 1-10.
- Roca J, Ahmad M, Panda SK, et al.** Hepatitis C virus genotyping in developing countries: Results from Cuba, India and Turkey. *Biotec. Aplic.* 1999; 16: 88-92.
- Rodríguez-Lay L, Villalba MC, Corredor MB, et al.** HCV genotype determination in monoinfected and HIV co-infected patients in Cuba. *Trans. R Soc. Trop. Med. Hyg.* 2012; 106(12): 711–717.
- Rose T, Henikoff J y Henikoff S.** CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13): 3763-3766.
- Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, et al.** Genotyping of Hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 3581-3584.
- Roth WK, Lee JH, Rüster B, et al.** Comparison of two quantitative hepatitis C virus reverse transcriptase PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34(2): 261–264.
- Saldanha J, Heath A, Leslie N, et al.** Calibration of HCV working reagents for NAT assays against the HCV International Standard. *Vox Sang* 2000; 78: 217-224.
- Saldanha J, Leslie N y Heath A.** Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA, WHO Collaborative Study Group. *Vox Sang.* 1999; 76: 149– 58.

- Sambrook J y Russel DW.** Molecular cloning: A laboratory manual. Tercera edición. Editorial Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 2001. pp 2344.
- Sangasang A, Wibulwattanakij S, Chanama S, et al.** Evaluation of RT-PCR as a tool for diagnosis of secondary dengue virus infection. *J. Infect. Dis.* 2003; 56: 205-9.
- Santana RR, Martínez Z, Martínez MT, et al.** Hepatitis C virus present in hemodialysis units from Cuban western region. *Rev. Cub. Med.* 2009; 48(3): 28-35.
- Sarrazin C.** Highly sensitive hepatitis C virus RNA detection methods: molecular backgrounds and clinical significance. *J. Clin. Virol.* 2002; 25 Suppl 3: S23-9.
- Sarrazin C, Gartner BC, Sizmann D, et al.** Comparison of conventional PCR with real-time PCR and branched DNA-based assays for hepatitis C virus RNA quantification and clinical significance for genotypes 1 to 5. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 729-37.
- Sarrazin C, Hendricks DA, Sedarati F, et al.** Assessment, by transcription-mediated amplification, of virologic response in patients with chronic hepatitis C virus treated with peginterferon alpha-2a. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 2850-5.
- Saunders GC y Parkers HC.** Analytical molecular biology. Quality and Validation. Editorial LGC (Laboratory of the Government Chemist), Teddington, Reino Unido, 1999. pp 58-102.
- Schaefer AK y Chung RT.** Anti-HCV drugs in development. *Gastroenterology* 2012; 142(6): 1340–1350.
- Scott JD y Gretch DR.** Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review. *Jama* 2007; 297: 724-32.
- Seeff LB.** Natural history of chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36(5 Suppl 1): S35-S46.
- Shepard CW, Finelli L y Alter MJ.** Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect. Dis.* 2005; 5(9): 558-567.
- Sigarroa, A.** Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de la Habana, Cuba, 1985. pp. 394.
- Simmonds P.** Genetic diversity and evolution of HCV- 15 years on. *J. Gen. Virol.* 2004; 85 (Pt-11): 3173-88.
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, et al.** Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005; 42(4): 962-973.

Strader DB, Wright T, Thomas DL, et al. Diagnosis, Management and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology* 2004; 39: 1147-1171.

Stuyver L, Wyseur A, Van Arnhem W, et al. Second generation line probe assays for Hepatitis C virus RNA genotyping. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34: 2259-2266.

Sugano M, Hayashi Y, Yoon S, et al. Quantitation of hepatitis C viral RNA in liver and serum samples using competitive polymerase chain reaction. *J. Clin. Pathol.* 1995; 48: 820-825.

Swango KL, Timken MD, Chong MD, et al. A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. *Forensic. Sci. Int.* 2006; 158: 14-26.

Tabor E. Workshop on implementation of Nucleic Acid Testing. Diciembre 14, 1999. Masur Auditorium, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, EE. UU. , 1999.

Taggart EW, Byington CL, Hillyard DR, et al. Enhancement of the AMPLICOR enterovirus PCR test with a coprecipitant. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 3408-09.

Tang YW, Procop GW y Persing DH. Molecular diagnostic of infectious diseases. *Clin. Chem.* 1997; 43(11): 2021-2038.

TecnoSUMA. Control de enfermedades infecciosas. 2013. [citado 13 de septiembre de 2013]. Disponible en: <http://www.tecnosuma.com/programasnacionales>.

Terrault NA, Pawlotsky JM, McHutchison J, et al. Clinical utility of viral load measurements in individuals with chronic hepatitis C infection on antiviral therapy. *J. Viral. Hepat.* 2005; 12: 465-72.

Thielmann K. Principios de metodología en bioquímica clínica. Editorial Instituto Cubano del Libro. Ciudad de la Habana, Cuba, 1973.

Thimme R, Binder M y Bartenschlager R. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol. Reviews* 2012; 36(3): 663-683.

Tholen D, Linnet K, Kondratovich M, et al. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: approved guideline. *NCCLS* 2010; 24(34).

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, et al. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461: 798-801.

Tijssen P. Hybridization with nucleic acid probes. Part II: probe labeling and hybridization techniques. Editorial Elsevier Science Publisher B.V., PC van der Vliet. Amsterdam, Holanda, 1993.

- Tokita H, Okamoto H, Iizuka H, et al.** Hepatitis C virus variants from Jakarta, Indonesia classifiable into novel genotypes in the 2e and 2f, 10a and 11a genetics groups. *J. Gen. Virol.* 1996; 77: 293-301.
- Trimoulet P, Halfon P, Pohier H, et al.** Evaluation of the VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantification of hepatitis C virus RNA in serum. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(6): 2031-2036.
- Tsukiyama K, Yamaguchi K, Maki N, et al.** Antigenicities of Group I and II hepatitis C virus polypeptides-molecular basis of diagnosis. *Virology* 1993; 192(2): 430-437.
- Tuaille E, Mondain AM, Meroueh F, et al.** Dried blood spot for Hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatology* 2010; 51: 752-758.
- Valdivia I, Ochoa R, Trujillo J, et al.** Importancia del pesquiasaje de hepatitis virales en el diseño de estrategias de vacunación. *VacciMonitor* 2005; 14(2): 7-12.
- Välímáa L, Ylikotila J, Kojola H, et al.** Streptavidin-coated spot surfaces for sensitive immunoassays using fluorescence surface readout. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008; 391(6): 2135-44.
- Veillon P, Payan C, Picchio G, et al.** Comparative evaluation of the total hepatitis C virus core antigen, Branched DNA, and Amplicor Monitor assays in determining viremia for patients with chronic hepatitis C during interferon plus ribavirin combination therapy. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 3121-30.
- Vermehren J, Kau A, Gärtner BC, et al.** Differences between Two Real-Time PCR-Based HCV Assays (RealTime HCV and Cobas AmpliPrep/Cobas TaqMan) and one signal amplification assay (Versant HCV RNA 3.0) for HCV RNA detection and quantification. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(12): 3880-3891.
- Vermehren J, Yu ML, Monto A, et al.** Multi-center evaluation of the Abbott RealTime HCV Assay for monitoring patients undergoing antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J. Clin. Virol.* 2011; 52: 133-7.
- Vilar E, Grá B, Arús E, et al.** VIUSID, a nutritional supplement, in combination with Interferon alfa-2b and Ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Liver Internat.* 2007; 27(2): 247-259.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al.** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med.* 2005; 11: 791-796.
- Walker-Peach R, Winkler M, DuBois DB, et al.** Ribonuclease-resistant RNA Controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA, and genotyping assays for hepatitis C virus. *Clin. Chem.* 1999; 45(12): 2079-2085.

- Wang CJ y Wu K.** Method for reducing non-specific priming in DNA amplification. N° US005348853A, 1994.
- Wang QT, Xiao W, Mindrinos M, et al.** Yeast tRNA as carrier in the isolation of microscale RNA for global amplification and expression profiling. *Biotechniques* 2002; 33 (4): 788-792.
- Xu M, Chan Y, Fischer SH, et al.** Improvement of AMPLICOR HIV Type 1 Viral Load Test (version 1.5) by addition of a coprecipitant during the RNA isolation step. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2616-2617.
- Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, et al.** In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96(5): 2291-2295.
- Yao J, Liu Z, Ko LS, et al.** Quantitative detection of HIV-1 RNA using NucliSens EasyQ HIV-1 assay. *J Virol. Methods* 2005; 129: 40-46.
- Young K, Resnick R y Myers T.** Detection of hepatitis C virus RNA by a combined reverse-transcriptase-polymerase chain reaction assay. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31: 882-886.
- Zaltron S, Spinetti A, Biasi L, et al.** Chronic HCV infection: epidemiological and clinical relevance. *BMC. Infect. Dis.* 2012; 12 Suppl 2: S2.
- Zeuzem S.** The kinetics of hepatitis C virus infection. *Clin. Liver Dis.* 2001; 5(4): 917-930.
- Zignego AL y Craxi A.** Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Clin. Liver Dis.* 2008; 12(3): 611-636.
- Zimmermann K y Mannhalter JW.** Technical aspects of quantitative competitive PCR. *BioTechniques* 1996; 21: 268-279.
- Zimmermann K, Turecek P, Schwarz HP, et al.** Methods for the preparation and use of internal standards for nucleic acid amplification assays. Patente USPTO 20020102548, 2002.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

Los resultados del trabajo han sido validados a través de su presentación en 24 eventos nacionales e internacionales, la obtención de doce premios en eventos científicos, la tutoría de un trabajo de diploma en la especialidad de Licenciatura en Biología y una Tesis de Especialidad de Grado I en Inmunología, además el asesoramiento en una tesis de diploma en Bioquímica y de una tesis de maestría en Bioquímica, mención Biología Molecular. Es autora y coautora de 10 trabajos científicos en revistas internacionales arbitradas y 5 informes técnicos de información tecnológica no publicable, dos registros sanitarios aprobados por el CECMED y dos patentes otorgadas por la OCPI.

Publicaciones.

1. **González YJ**, I González, A Viña, A Armas, I García y RL Solís. Development of a molecular diagnostic system for detection of HCV RNA. *Biotecnología Aplicada* 20(2):122-5. 2003
2. González, I., A. Viña, A. Armas, I. García y **YJ. González**. Design of an antisense reverse-transcriptase-polymerase chain reaction primer efficient for all hepatitis C virus genotypes: Comparison of its performance vs a commercial primer. *Analytical Biochemistry* 315:281-4, 2003
3. González, I., **YJ. González**, A. Armas, A. Viña, A. Medina, N. Trujillo, M. T. Perez y R. L. Solís. Validation of a nested PCR assay UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO for the detection of Hepatitis C Virus. *Biologicals* 31: 55-61, 2003
4. González, I., **YJ. González**, A. Viña, A. Armas y R. L. Solís. The usefulness of UMELOSA[®] HCV CUALITATIVO kit as supplemental test for confirmation of HCV infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 37: 25-27, 2004
5. González I., A. Armas, Y. Perea, I. García, **YJ. González**, C. Silva y R. Robaina. Long-term conservation of HCV RNA at 4°C using a new RNA stabilizing solution. *Journal of Virological Methods*.168: 207-211, 2010.
6. Perea Y., A. Armas, **YJ. González**, C.M. Laza. Stability of standard curves of hepatitis C virus transcripts used for viral quantification. *Biotecnología Aplicada*; 26 (3):1- 4, 2009.
7. Nodarse-Cuní, H., E. Arús, L.L Rivera, M. Pérez, M. Samada, W.O. García, Y.A. Sánchez, D. Pupo, A. Obregón, I. Umpierre, O. Martínez, A. Moret, **YJ. González**, Y. Bermúdez, E. García, O.C. Lazo, P. López-

Saura. Interferon alpha-2b and ribavirin as combined therapy for chronic hepatitis C in Cuba: National Program. *Biotecnología Aplicada*. 29:184-188, 2012.

Otras publicaciones relacionadas

1. Armas A., I. García, E. Morales, V. Alonso, I. González, J. Gentile, Y. Perea y **YJ. González**. Validation of the TEMPER thermocycler in nucleic acid amplification by polymerase chain reaction. *Biotecnología Aplicada* 23:312-316, 2006.
2. González, I., A. Armas, I. García y **YJ. González**. Homemade viral RNA isolation protocol using silica columns: A comparison of four protocols. *Analytical Biochemistry* 360:148–150, 2007.
3. González I., I. García, A. Armas, Y. Perea, **YJ. González**, Y. Rosario, S. Dueñas. Scaling up in vitro transcription synthesis of RNA standards for competitive quantitative RT-PCR: Looking for bigger yields. *Analytical Biochemistry* 385: 179–181, 2009.

Patentes otorgadas por la OCPI: (ANEXO 10)

1. Año 2010, Nro.: 23530. "Cebadores y sondas de la región 5' no traducida del VHC altamente sensibles y específicas". I González, A Viña, **Y González**, A Armas, I García, Y Perea
2. Año 2010, Nro.: 23588. "Composición estabilizadora de ácidos nucleicos para su conservación a 4°C por períodos prolongados". I González, A Armas, I García, Y Perea, **YJ González**, C Silva y R Robaina.

Registros Sanitarios del CECMED: (ANEXO 11)

1. Registro Sanitario del UMELOSA® HCV CUALITATIVO. No. D0206-18C. 2002.

González YJ, I González, A Armas, RL Solís y A. González.

2. Registro Sanitario del UMELOSA® VHC CUANTITATIVO. No. D12-2010. 2010.

González YJ, A Armas, I González, Y. Perea, I García y A. González.

Eventos nacionales e internacionales relevantes

1. IV y V Simposio Nacional sobre hepatitis virales. CIGB, 2000 y 2001.
2. 6th International Symposium on positive strand RNA viruses. Instituto Pasteur, Francia 2001.
3. HEMATOLOGÍA 2001, Palacio de las Convenciones, Mayo 14-18, Habana. Cuba, 2001.
4. HEPATOLOGÍA (2002, 2006, 2008 y 2010), CIMEQ, Habana. Cuba.
5. EUROBIOCHIPS 2002. Berlín, Alemania. 2002

6. Simposio de Bioinformática Cuba-Francia. Febrero, 2003. ISCTN, Habana, Cuba.
7. BIOTECNOLOGÍA HABANA 2003, Noviembre 23-28. CIGB, Habana, Cuba.
8. XVII Reunión de la Asociación Latinoamericana para el Estudio del Hígado. Brasil, 2004.
9. 5th International Symposium on Molecular Diagnostics in Laboratory Medicine. Austria, 2004.
10. Immunotherapy in Viral Hepatitis B and C. Varadero. 27-30 Abril.2005
11. V, VI y VII Congreso de la Sociedad Cubana de Inmunología. 2006, 2008, 2011.
12. CONAPAC 2012. Habana, Cuba.
13. Congreso Internacional QUÍMICA 2012, Habana, Cuba. 2012.

Premios

1. Premio Anual de la Salud Pública, 2002 (Ministerio de Salud Pública)
2. Premio Nacional 2002 de la Academia de Ciencias de Cuba, 2003 (ACC)
3. Premio Nacional de la Innovación Tecnológica, 2003 (Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente)
4. Premios Relevantes, Fóruns de Ciencia y Técnica: 1994/ 95/ 2000/ 02/ 04/ 09/10. CIE
5. Premio Evento Internacional: HEPATOLOGÍA 2006 (CIMEQ)
6. Dos Premios Relevante Especial XVI Fórum de Ciencia y Técnica, 2009 (Nivel Provincial).

ANEXOS

ANEXO 1. Visualización de los resultados del UMELOSA HCV CUALITATIVO

Software para Lectores de Tiras

Sistema Ensayos Placas Pacientes Reportes Ayuda

UMELOSA HCV CUALITATIVO - Placa: P231031030m

CN	N1	5.78	N2	5.52	CN	5.65
CP	P1	210.00	P2	210.00	CP	210.00

Nivel de Corte:(Fluor1+F) 140

N.	Código	Fluor1	Fluor2	Media	Result...
1	MN1	7.39	6.43	6.91	
2	MN2	6.12	43.17	24.65	
3	MP1 alta (rep 1)	210....	210....	210....	Positivo
4	MP1 alta (rep 2)	210....	210....	210....	Positivo
5	MP1 alta (rep 3)	210....	210....	210....	Positivo
6	MP1 media (rep 1)	210....	210....	210....	Positivo
7	MP1 media (rep 2)	210....	210....	210....	Positivo
8	MP1 media (rep 3)	210....	210....	210....	Positivo
9	MP1 baja (rep 1)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP1 baja (rep 2)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP1 baja (rep 3)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 alta (rep 1)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 alta (rep 2)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 alta (rep 3)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 media (rep 1)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 media (rep 2)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 media (rep 3)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 baja (rep 1)	210....	210....	210....	Positivo
1..	MP2 baja (rep 2)	210....	210....	210....	Positivo
2..	MP2 baja (rep 3)	210....	210....	210....	Positivo
2..	E3 (CN UMELOSA)	5.10	6.87	5.98	
2..	E4 (CP UMELOSA)	210....	210....	210....	Positivo

Legenda: CN o E3: Control Negativo; CP o E4: Control Positivo;

MN: Muestras Negativas; MP: Muestras Positivas

ANEXO 2. Visualización de los resultados del UMELOSA VHC CUANTITATIVO

Software para Lectores de Tiras

Sistema Ensayos Placas Pacientes Reportes Ayuda

UMELOSA VHC CUANTITATIVO - Placa: 1211081125mi

Estándar	FminVHC	FmaxVHC	MediaVHC	FminEI	FmaxEI	MediaEI	Relación
Control Neg.	2.30	2.42	2.36	154.81	158.14	156.47	0.015
15488.10	32.18	34.07	33.13	144.75	147.81	146.28	0.226
15488.10	132.50	134.81	133.66	147.74	156.09	151.92	0.880
15488.10	156.00	172.67	164.33	97.14	109.52	103.33	1.590
CC	136.81	139.29	138.05	103.76	153.58	128.67	1.073

CC	Lim. Inf.	Lim. Sup.	UI/mL
	0.00E+00	1.00E+06	3.08E+04
r ²	0.974		
pendiente	0.535		

N...	Código	F1VHC	F2VHC	Media...	F1EI	F2EI	MediaEI	Relac...	UI/mL	Observaciones
1	C1 (6)	89.980	119.170	104.575	151.290	149.350	150.320	0.696	1,25E+04	
2	C1 (7)	92.850	96.320	94.585	146.710	155.400	151.055	0.626	1,01E+04	
3	C1 (8)	51.640	85.350	68.495	131.570	135.410	133.490	0.513	7,23E+03	
4	C1 (9)	56.920	59.280	58.100	150.880	112.490	131.685	0.441	5,62E+03	
5	C1 (10)	86.690	84.280	85.485	150.000	140.180	145.090	0.589	9,04E+03	
6	C2 (11)	73.730	69.890	71.810	148.300	146.050	147.175	0.488	6,34E+03	
7	C2 (12)	89.960	98.820	94.390	128.110	132.780	130.445	0.724	1,32E+04	
8	C2 (13)	112.830	112.490	112.660	106.670	94.470	100.570	1.120	3,03E+04	
9	C2 (14)	108.390	112.270	110.330	126.650	128.470	125.060	0.882	1,92E+04	
10	C2 (15)	81.120	100.660	90.890	104.450	102.040	103.245	0.880	1,94E+04	
11	C3 (16)	121.170	129.750	125.460	104.190	108.950	106.570	1.177	3,29E+04	
12	C3 (17)	98.150	93.930	96.040	119.780	116.640	118.210	0.812	1,64E+04	
13	C3 (18)	113.260	118.700	115.980	75.130	120.320	97.725	1.187	3,80E+04	
14	C3 (19)	110.730	111.020	110.875	134.070	116.060	125.065	0.887	1,96E+04	
15	C3 (20)	92.570	132.340	112.455	102.640	103.490	103.065	1.091	2,92E+04	
16	CC 1:5 ...	70.990	68.070	69.530	142.300	135.100	138.700	0.501	6,67E+03	
17	CC 1:5 ...	76.110	60.780	68.445	156.770	88.500	122.635	0.558	9,15E+03	
18	CC 1:5 ...	68.750	80.480	74.615	32.340	82.780	57.560	1.296	-	>1,55E+05
19	CC 1:5 ...	87.070	85.980	86.525	115.570	133.880	124.725	0.694	1,24E+04	

Leyenda: Ctl Neg: Control Negativo; CC: Control de Calidad; Lim. Inf.: Límite inferior del CC; Lim Sup.: Límite superior del CC; r²: coeficiente de determinación de la regresión lineal ponderada; Relación (R): MediaVHC/ MediaEI; Gráfico: Log₁₀ R vs Log₁₀ Concentración (UI/mL)

ANEXO 3. Resultados de estudios de estabilidad de estándares del ARN del VHC almacenados en
Tampón de lisis (TL) a 4 °C hasta 12 meses con un ARN heterólogo.

Patente No. 23588, 2010.

Tabla 3A. Estudios de estabilidad de estándares del ARN del VHC almacenados en TL a 4 °C hasta 12 meses con un ARN heterólogo.

Tiempo de conservación	3 meses	6 meses	12 meses	24 meses
	Log Carga Viral VHC (UI/mL). Medias			
TL+ARN VHC, 4°C	2,91E+04	2,09E+04	3,36E+04	3,75E+04
TL+ARN VHC,-20°C	8,68E+04	2,16E+04	1,01E+04	9,46E+04

Tabla 3B. Carga Viral a los 6, 14 y 24 meses con respecto a los 3 meses, para muestras conservadas a 4 °C y -20 °C.

Diferencia entre estimaciones de Carga Viral en Log ₁₀		
3 meses/ 6 meses	3 meses/ 14 meses	3 meses/ 24 meses
Muestras a 4°C		
-0,14	0,06	0,11
Muestras a -20°C		
-0,60	-0,94	0,04

ANEXO 4. Evaluación de la especificidad analítica o reactividad cruzada con otros microorganismos
para el UMELOSA HCV CUALITATIVO y el UMELOSA VHC CUANTITATIVO

Tipo de muestra	No. muestras	UMELOSA HCV CUALITATIVO	UMELOSA VHC CUANTITATIVO
		Fluorescencia (UF)	Carga viral ARN VHC (UI/mL)
VHA	7	17,0 ± 5,6	< C1
VHB	7	14,8 ± 5,4	< C1
VLTH	2	12,6 ± 2,7	< C1
VIH 1/2	8	14,5 ± 5,1	< C1
Dengue	5	10,6 ± 2,7	< C1
Fiebre amarilla (cepa viral)	1	13,6 ± 2,9	< C1
Encefalitis de San Luis (cepa viral)	1	15,2 ± 0,1	< C1
Trypanosoma cruzi	5	18,0 ± 2,0	< C1
Hepatitis Autoinmune	2	11,9 ± 2,0	< C1

*Leyenda: Ensayo cualitativo los resultados No detectables son < 40 UF
Ensayo cuantitativo los resultados No cuantificables son < C1*

ANEXO 5. Evaluación de Robustez en el UMELOSA HCV CUALITATIVO

ANEXO 5A. Robustez con muestras positivas de baja carga viral, evaluadas en diferentes condiciones

Positivas (Baja Carga viral) (n=24)	Resultados
Muestra 1	210 ± 0
Muestra 2	210 ± 0
Muestra 3	210 ± 0
Muestra 4	210 ± 0
Muestra 5	210 ± 0
Muestra 6	210 ± 0
Muestra 7	210 ± 0
Muestra 8	210 ± 0

ANEXO 5B. Robustez para detectar contaminación cruzada

No.	Muestras	Resultados	No.	Muestras	Resultados
Muestra 1	Positiva	210 ± 0	Muestra 12	Negativa	13,2 ± 2,3
Muestra 2	Negativa	8,7 ± 0,3	Muestra 13	Positiva	210 ± 0
Muestra 3	Positiva	210 ± 0	Muestra 14	Negativa	14,7 ± 0,8
Muestra 4	Negativa	21,4 ± 1,9	Muestra 15	Positiva	210 ± 0
Muestra 5	Positiva	210 ± 0	Muestra 16	Negativa	10,6 ± 0,3
Muestra 6	Negativa	16,3 ± 0,6	Muestra 17	Positiva	210 ± 0
Muestra 7	Positiva	210 ± 0	Muestra 18	Negativa	23,7 ± 1,2
Muestra 8	Negativa	9,9 ± 0,8	Muestra 19	Positiva	210 ± 0
Muestra 9	Positiva	210 ± 0	Muestra 20	Negativa	15,4 ± 2,7
Muestra 10	Negativa	16,3 ± 1,4	Muestra 21	Positiva	210 ± 0
Muestra 11	Positiva	210 ± 0	Muestra 22	Negativa	20,5 ± 0,6

ANEXO 6. Exactitud Genotípica entre UMELOSA VHC CUANTITATIVO y AMPLICOR HCV Monitor

(Cuantificación de 35 muestras de los genotipos 1, 2, 3 y 6 del VHC)

Muestra	Genotipo	UMELOSA VHC CUANTITATIVO		Amplior HCV Monitor		Dif Log ₁₀	Dif, Log ₁₀ V. Absoluto	
		Concentración (UI/mL)	Log ₁₀	Concentración (UI/mL)	Log ₁₀			
190	1	1,51E+06	6,18	1,74E+06	6,24	-0,06	0,06	
333	1	2,06E+06	6,31	2,09E+06	6,32	-0,01	0,01	
1134	1	7,56E+04	4,88	2,69E+05	5,43	-0,55	0,55	
1153	1	2,21E+06	6,34	2,14E+06	6,33	0,01	0,01	
353-IP	1	1,29E+06	6,11	1,70E+06	6,23	-0,12	0,12	
9568(7)	1	7,61E+06	6,88	4,18E+06	6,62	0,26	0,26	
9571(6)	1	2,26E+06	6,35	5,14E+06	6,71	-0,36	0,36	
9564	1	6,86E+06	6,84	5,52E+06	6,74	0,09	0,09	
9572(8)	1	4,52E+06	6,66	1,79E+06	6,25	0,40	0,40	
9569	1	5,37E+05	5,73	8,97E+05	5,95	-0,22	0,22	
9567	1	7,34E+06	6,87	7,28E+06	6,86	0,00	0,00	
9570	1	1,10E+05	5,04	1,21E+05	5,08	-0,04	0,04	
9573	1	3,89E+05	5,59	6,69E+05	5,83	-0,24	0,24	
P189	1	1,77E+06	6,25	1,96E+06	6,29	-0,05	0,05	
337-IP	1	1,87E+04	4,27	1,38E+04	4,14	0,13	0,13	
132	1	7,06E+05	5,85	1,17E+06	6,07	-0,22	0,22	
3CRS	1	1,66E+06	6,22	1,86E+06	6,27	-0,05	0,05	
1101	1	1,22E+05	5,09	1,78E+05	5,25	-0,16	0,16	
156	1	5,38E+05	5,73	4,79E+05	5,68	0,05	0,05	
551	1	2,88E+06	6,46	1,38E+06	6,14	0,32	0,32	
346	1	3,25E+05	5,51	2,14E+05	5,33	0,18	0,18	0,17
ECII	2	764852,13	5,88	1,13E+06	6,05	-0,17	0,17	
1357	2	7,69E+04	4,89	4,07E+04	4,61	0,28	0,28	
ECII-33	2	2,31E+06	6,36	2,37E+06	6,37	-0,01	0,01	
IG 20	2	2,80E+04	4,45	6,64E+04	4,82	-0,37	0,37	
1172	2	1,96E+04	4,29	2,19E+04	4,34	-0,05	0,05	
IG-10	2	5,81E+06	6,76	5,14E+06	6,71	0,05	0,05	0,16
IG-23	3	8,21E+05	5,91	8,77E+05	5,94	-0,03	0,03	
774-IP	3	5,35E+03	3,73	5,28E+03	3,72	0,01	0,01	
P197	3	1,50E+05	5,18	1,14E+06	6,06	-0,88	0,88	
ECII-P4	3	7,02E+05	5,85	8,08E+05	5,91	-0,06	0,06	
IP-57	3	5,38E+06	6,73	5,39E+06	6,73	0,00	0,00	0,20
2(L)	6	4,12E+06	6,61	4,17E+06	6,62	-0,01	0,01	
5(L)	6	7,80E+06	6,89	5,01E+06	6,70	0,19	0,19	
360	6	1,84E+05	5,27	2,19E+05	5,34	-0,07	0,07	0,09
Promedio de las diferencia Log ₁₀ de los 4 genotipos								0,16

**ANEXO 7. Análisis probabilístico PROBIT del ensayo UMELOSA® VHC CUANTITATIVO
(FINNEY, 1971)**

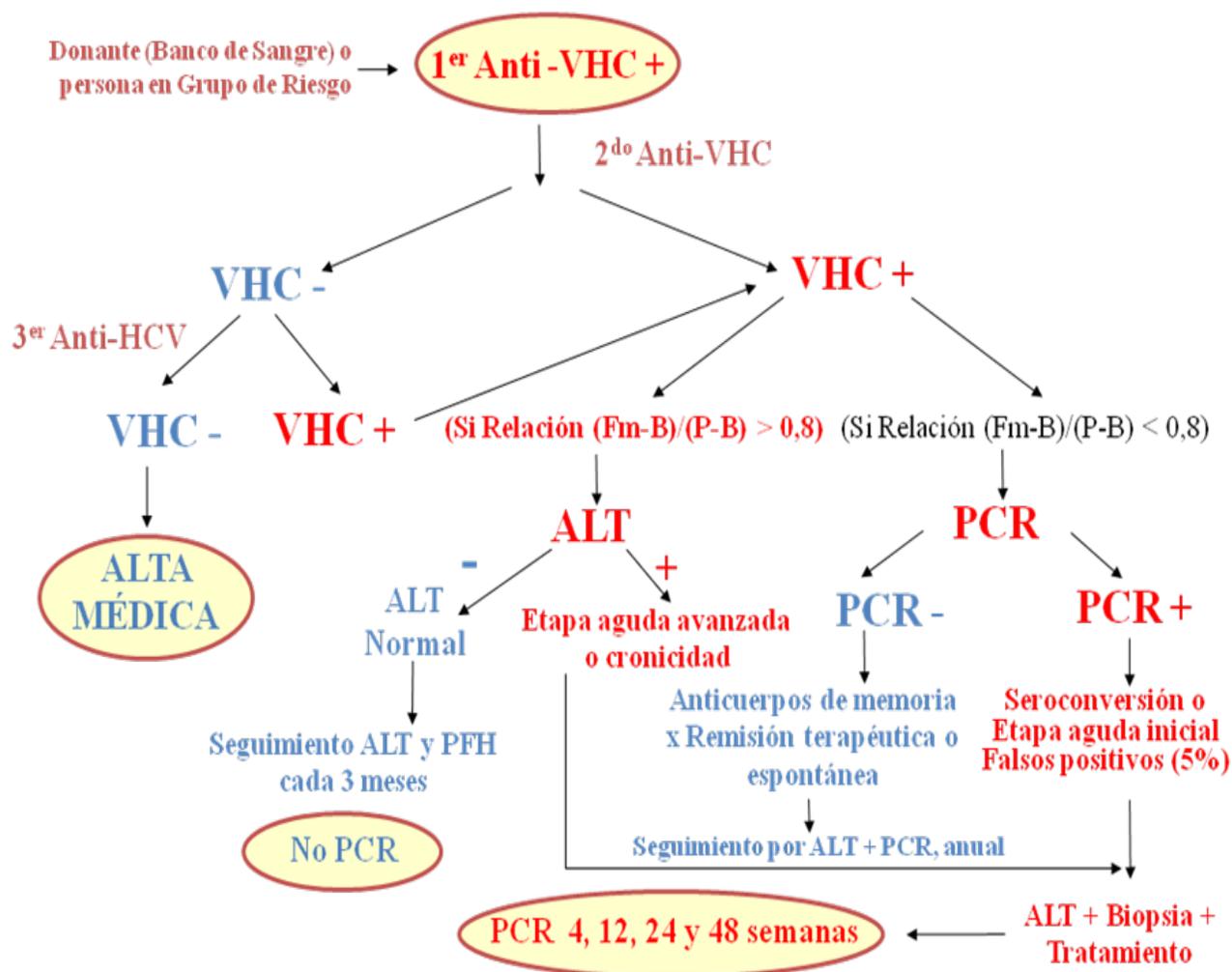
Porcentaje	Percentil	Error	Inferior	Superior
1	-693,413	196,396	-1339,58	-417,944
2	-598,236	176,978	-1179,35	-349,503
3	-537,850	164,715	-1077,79	-305,967
4	-492,423	155,526	-1001,48	-273,142
5	-455,472	148,080	-939,451	-246,387
6	-424,021	141,766	-886,704	-223,568
7	-396,444	136,249	-840,495	-203,521
8	-371,753	131,326	-799,156	-185,535
9	-349,297	126,866	-761,592	-169,146
10	-328,626	122,775	-727,045	-154,029
20	-175,026	93,0233	-471,636	-40,3926
30	-64,2694	72,8081	-290,017	44,0961
40	30,3680	57,3109	-138,610	120,069
50	118,823	45,8946	-3,98698	197,972
60	207,279	40,1340	116,945	289,566
70	301,916	42,8536	223,668	410,222
80	412,673	55,6144	324,832	575,165
90	566,273	81,2830	447,044	821,999
91	586,944	85,0704	462,782	855,925
92	609,400	89,2394	479,765	892,896
93	634,091	93,8802	498,322	933,663
94	661,667	99,1237	518,923	979,318
95	693,119	105,170	542,284	1031,52
96	730,070	112,348	569,578	1093,01
97	775,496	121,264	602,948	1168,78
98	835,883	133,239	647,062	1269,76
99	931,060	152,321	716,171	1429,32

*LD al 95 porciento: **693,12 UI/mL** (intervalo de confianza **542,28 a 1031,52 UI/mL**)*

ANEXO 8. Análisis comparativo de los resultados entre el AMPLICOR HCV MONITOR® y el UMELOSA® VHC CUANTITATIVO

No.	Muestra	Concentración ARN del VHC (UI/mL)			Log ₁₀ (Concentración ARN del VHC)		
		Fact. Dil.	Amplicor	UMELOSA	Amplicor	UMELOSA	Diferencia Log ₁₀
1	23860	1	3,46E+04	6,37E+04	4,54	4,8	-0,26
2	23980	10	2,47E+05	1,27E+05	5,39	5,1	0,29
3	23979	10	5,08E+05	2,85E+05	5,71	5,45	0,26
4	23938	10	5,92E+05	6,88E+05	5,77	5,84	-0,07
5	23992	10	7,62E+05	5,47E+05	5,88	5,74	0,14
6	23978	10	2,28E+05	2,62E+05	5,36	5,42	-0,06
7	23998	100	7,19E+06	5,05E+06	6,86	6,7	0,16
8	23969	100	3,40E+06	4,15E+06	6,53	6,62	-0,09
9	23814	100	1,64E+06	1,40E+06	6,21	6,14	0,07
10	23974	10	7,40E+05	4,74E+05	5,87	5,68	0,19
11	23854	100	8,53E+06	1,85E+07	6,93	7,27	-0,34
12	23990	100	1,08E+06	1,20E+06	6,03	6,08	-0,05
13	EC1	100	9,46E+06	1,08E+07	6,98	7,03	-0,05
14	EC2	100	7,25E+06	6,56E+06	6,86	6,82	0,04
15	EC4	10	4,53E+05	4,48E+05	5,66	5,65	0,01
16	EC5	10	4,46E+05	1,53E+05	5,65	5,18	0,47
17	EC10	100	5,13E+06	4,46E+06	6,71	6,65	0,06
18	EC13	10	3,03E+05	2,18E+05	5,48	5,34	0,14
19	23951	1	4,55E+03	9,20E+03	3,66	3,96	-0,3
20	13	100	1,83E+06	6,33E+06	6,26	6,8	-0,54
21	30	100	4,00E+06	3,16E+06	6,6	6,5	0,1
22	31	10000	1,97E+07	3,15E+07	7,29	7,5	-0,21
23	32	10	4,37E+05	7,66E+05	5,64	5,88	-0,24
24	34	100	2,37E+06	4,95E+06	6,37	6,69	-0,32
25	35	10	3,46E+04	8,72E+04	4,54	4,94	-0,4
26	36	100	8,86E+06	6,33E+06	6,95	6,8	0,15
27	37	100	2,03E+06	3,78E+06	6,31	6,58	-0,27
28	39	100	1,05E+06	4,40E+06	6,02	6,64	-0,62
29	40	100	7,88E+06	5,43E+06	6,9	6,73	0,17
30	41	100	1,76E+06	6,66E+06	6,25	6,82	-0,57
31	43	1000	2,17E+06	6,68E+06	6,34	6,82	-0,48
32	44	100	4,59E+06	5,84E+06	6,66	6,77	-0,11
33	74	100	6,25E+06	8,85E+06	6,8	6,95	-0,15
34	4	100	8,61E+06	6,33E+06	6,93	6,8	0,13
35	9	10	3,75E+05	2,83E+05	5,57	5,45	0,12
36	21	1	3,57E+04	2,24E+04	4,55	4,35	0,2
38	42	100	4,40E+06	3,80E+06	6,64	6,58	0,06
39	45	1	1,33E+05	1,56E+05	5,12	5,19	-0,07
40	49	10	3,60E+05	3,11E+05	5,56	5,49	0,07
41	50	100	3,86E+06	2,55E+06	6,59	6,41	0,18
42	EPB	10	2,13E+06	2,92E+06	6,33	6,47	-0,14
43	17	100	2,73E+05	3,60E+05	5,44	5,56	-0,12
44	60	10	2,67E+06	7,30E+06	6,43	6,86	-0,43
45	3322	1	2,20E+04	6,66E+04	4,34	4,82	-0,48
46	23820	10	2,15E+05	1,88E+05	5,33	5,28	0,05
47	23941	10	6,64E+05	4,85E+05	5,82	5,69	0,13
48	23947	10	3,06E+06	6,85E+05	6,49	5,84	0,65
49	23857	10	4,60E+05	2,77E+05	5,66	5,44	0,22
50	23975	100	1,48E+06	3,25E+05	6,17	5,51	0,66
Promedio diferencia Log ₁₀ =							0,24

ANEXO 9. ALGORITMO DE PESQUISA DEL VHC



Nueva propuesta de algoritmo de pesquisa del VHC, basado en la respuesta de anticuerpos anti-VHC obtenidas por el ensayo UMELISA HCV. Si una persona es repetidamente seropositiva al VHC y su Relación $(Fm-B)/(P-B)$ es mayor que 0,8, es muy probable que se encuentre en una etapa aguda avanzada o en la etapa crónica de la infección donde la correlación de los resultados con el ARN viral son de 100%; sin embargo si esta Relación es menor que 0,8, la persona puede estar en la fase de seroconversión, en la etapa aguda inicial o ser un falso positivo de la prueba de anticuerpos y por ello es imprescindible realizar un estudio de ARN viral para confirmar la presencia o no del VHC. **Leyenda:** Fm: Fluorescencia de la muestra; B: Fluorescencia del blanco; P: Fluorescencia del positivo. ALT: Alanina aminotransferasa; PFH: Pruebas funcionales hepáticas.

ANEXO 10: PATENTES OTORGADAS



REPÚBLICA DE CUBA

La Directora General de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido en las disposiciones legales vigentes, concede el presente:



CERTIFICADO DE PATENTE DE INVENCION

(72) Autores:

IDANIA GONZÁLEZ PÉREZ
ARIEL VIÑA RODRÍGUEZ
YAIMÉ JOSEFINA GONZÁLEZ GONZÁLEZ
ANNY ARMAS CAYARGA
IRIA GARCÍA DE LA ROSA
YENITSE PEREA HERNÁNDEZ

(73) Titular:

CENTRO DE INMUNOENSAYO, con domicilio legal en calle 134 y avenida 25, número 6945, Cubanacán, 11600, Playa, La Habana, República de Cuba.

(11) Certificado Nro.: **23530**

Concedido por Resolución No. 815/2010

(17) Válido hasta el 3 de marzo de 2025.

Modificado por la Disposición transitoria IV Decreto-Ley número 290

(54) Título: **CEBADORES Y SONDAS DE LA REGIÓN 5' NO TRADUCIDA DEL VHC ALTAMENTE SENSIBLES Y ESPECÍFICOS**

Dado en La Habana, a 23 de octubre de 2012.


M.Sc. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora General
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial



REPÚBLICA DE CUBA

La Directora General de la Oficina Cubana de la Propiedad Industrial, en uso de sus facultades y de acuerdo con lo establecido en las disposiciones legales vigentes, concede el presente:



CERTIFICADO DE PATENTE DE INVENCION

(72) Autores:

IDANIA GONZÁLEZ PÉREZ
ANNY ARMAS CAYARGA
IRIA GARCÍA DE LA ROSA
YENITSE PEREA HERNÁNDEZ
YAIMÉ JOSEFINA GONZÁLEZ GONZÁLEZ
CARLOS SILVA LEÓN
RENÉ ROBAINA ÁLVAREZ

(73) Titulares:

CENTRO DE INMUNOENSAYO, con domicilio legal en calle 134 y avenida 25, número 6945, Cubanacán, 11600, Playa, La Habana, República de Cuba.

(11) Certificado Nro.: **23588**

Concedido por Resolución No. 1963/2010

(17) Válido hasta el 29 de mayo de 2027.

Modificado por la Disposición transitoria IV Decreto-Ley número 290

(54) Título: **COMPOSICIÓN ESTABILIZADORA DE ÁCIDOS NUCLEICOS PARA SU CONSERVACIÓN A 4 GRADOS CELSIUS POR PERÍODOS PROLONGADOS**

Dado en La Habana, a 23 de octubre de 2012.


M.Sc. María de los Angeles Sánchez Torres
Directora General
Oficina Cubana de la Propiedad Industrial

ANEXO 11: REGISTROS SANITARIOS, CECMED



REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
CENTRO PARA EL CONTROL, ESTATAL, DE
MEDICAMENTOS, EQUIPOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS
CECMED

CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO

Se otorga el presente como constancia de que se ha autorizado la comercialización en el territorio nacional del producto que a continuación se describe, dando cumplimiento así a lo establecido en el Reglamento para el Registro Sanitario de Diagnosticadores vigente.

- | | | |
|---|--|-------------------------------|
| 1. PRODUCTO | UMELOSA HCV CUALITATIVO | |
| 1.1 Aplicación | Para la detección del ARN del VHC en suero y plasma humano. | |
| 1.2 Presentación | UM 3001 (para 96 pruebas). | |
| 1.3 Almacenamiento | Caja 1: De 2 a 8 °C
Caja 2: a -20 °C | |
| 1.4 Periodo de validez | 7 meses. | |
| 2. TITULAR | Centro de Inmunoensayo | 2.1 País CUBA |
| 2.2 Domicilio legal | Calle 134 y Ave. 25, Playa, Apdo. 6653, La Habana. | |
| 2.3 Razón social | Fabricante. | |
| 3. FABRICANTE | El TITULAR. | 3.1 País CUBA |
| 3.2 Domicilio legal | Calle 134 y Ave. 25, Playa, Apdo. 6653, La Habana. | |
| 4. INSCRIPCIÓN No. | D0206-18 | 4.1 Fecha 2002-06-17 |
| 5. RELACIÓN DE COMPONENTES DEL PRODUCTO | (Ver Anexo). | |
| 6. RENOVACIÓN | <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO | Fecha de aprobación: 4JUL2012 |
| 7. MODIFICACIÓN | <input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO | Fecha de aprobación: 4JUL2012 |

Aspectos modificados:

1. Extensión del periodo de validez del producto y del componente El Tampón de Lisis.

8. OBSERVACIONES: No procede.

Este Certificado es válido única y exclusivamente para lo declarado en el expediente de Registro del producto descrito, que obra en poder del CECMED, y cuya vigencia expira en la fecha 2007-06.

DR. RAFAEL B. PÉREZ CRISTIA
DIRECTOR GENERAL.





REPÚBLICA DE CUBA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA

CENTRO PARA EL CONTROL ESTATAL DE LA CALIDAD DE LOS MEDICAMENTOS

CERTIFICADO DE REGISTRO SANITARIO

Se otorga el presente como constancia de que se ha autorizado la comercialización en el territorio nacional del producto que a continuación se describe, dando cumplimiento así a lo establecido en el Reglamento para el Registro Sanitario de Diagnosticadores vigente.

1. PRODUCTO	UMELOSA VHC CUANTITATIVO	
1.1 Aplicación	Para la cuantificación del ARN del VHC en suero y plasma humano.	
1.2 Presentación	UM 3002 (para 48 pruebas).	
1.3 Almacenamiento	Caja 1: de 2 a 8 °C Caja 2: a -20 °C	
1.4 Período de validez	6 meses.	
2. TITULAR	Centro de InmunoEnsayo	2.1 País CUBA
2.2 Domicilio legal	Calle 134 y Ave. 25, Playa, Apdo. 6653, Ciudad de La Habana.	
2.3 Razón social	Fabricante.	
3. FABRICANTE	El TITULAR.	3.1 País -
3.2 Domicilio legal	-	
4. INSCRIPCIÓN No.	D1002-10	4.1 Fecha 24 FEB 2010

Este Certificado es válido única y exclusivamente para lo declarado en el Expediente de Registro del producto descrito, que obra en poder del CECMED, y cuya vigencia expira en la fecha : 2015-02

**ANEXO 12: AVAL DE VALIDACIONES Y APLICACIONES DEL
UMELOSA HCV CUALITATIVO**

**ANEXO 13: AVAL DE EVALUACIONES DEL
UMELOSA VHC CUANTITATIVO**