

EVALUACIÓN COMPARATIVA DEL COBAS AMPLICOR HCV MONITOR v2.0 Y EL VERSANT b-DNA HCV 3.0 COMO HERRAMIENTAS PARA LA MONITORIZACIÓN DE LA CARGA VIRAL EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS C

Ivonne Avalos Redón, Andrés Antón Pagarolas, Blanca Bermejo Barrera

Unidad de Virología y Microbiología Molecular

c/ Provença 312 bajos, CP 08037, Barcelona www.echevarne.es

INTRODUCCIÓN

El diagnóstico virológico molecular basado en el genotipado y la cuantificación del ARN viral se ha convertido en uno de los factores predictivos fundamentales para el abordaje terapéutico de los pacientes con Hepatitis C. Las técnicas de cuantificación disponibles varían en el rango dinámico, pero la incorporación del estándar internacional de la OMS y la definición de Unidades Internacionales (UI/ml) han facilitado la interpretación de los valores de carga viral (CV), independientemente del método empleado.¹

El consenso del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos para el manejo de la Hepatitis C y la Primera conferencia Europea para el tratamiento de las Hepatitis B y C en pacientes coinfectados con VIH, describen la conocida "regla de los 2 \log_{10} ", según la cual los individuos con un descenso de la CV superior a 100 veces después de 12 semanas de tratamiento antiviral tendrán una respuesta virológica sostenida que permitirá la interrupción de la terapia, con el consecuente ahorro de efectos adversos y costes.^{2,3}

Otras guías médicas establecen un valor de corte de 10^5 UI/ml (habitualmente 700.000 u 800.000 UI/ml); un nivel por debajo del valor de corte es un factor predictivo positivo de respuesta al tratamiento, mientras que una CV alta se asocia con frecuencia a una respuesta virológica lenta o en ocasiones fallida, que condicionará la agresividad o la continuidad del tratamiento.⁴ Además se han reportado casos crónicos con CV baja que han experimentado una remisión espontánea de la enfermedad.⁵

En nuestro laboratorio hemos tenido la posibilidad de contar con dos técnicas cuantitativas:

i) Cobas amplificador HCV Monitor v2.0: basada en una Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa competitiva a tiempo final (qRT-PCR)(Roche Diagnostics).

ii) Versant b-DNA HCV 3.0: consistente en la captura e hibridación en cascada ramificada ("branched") para aumentar la señal de detección (bDNA)(Bayer HealthCare).

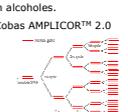
Con este estudio nos hemos propuesto verificar si los valores de CV obtenidos por ambos métodos en muestras y en controles internacionales son comparables; además hemos comprobado si, de existir diferencias, éstas son aceptables y si pueden influir en la toma de decisiones para la aplicación o modificación de la terapia antiviral.

MATERIALES y MÉTODOS

- ✓ MUESTRAS: suero de 78 pacientes en diferentes estadios de infección crónica por el virus de la Hepatitis C.
- ✓ CONTROLES: 5 Controles de Calidad Internacional (3 positivos y 2 negativos) procedentes del College of American Pathologists (CAP, Seracon Diagnostics, US).
- ✓ PROCEDIMIENTO BÁSICO SEMIAUTOMÁTICO según las indicaciones de los fabricantes:

- Extracción manual del ARN viral a muestras y estándares externos mediante lisis con un agente caotrópico que contiene cantidades conocidas de un control interno, seguida de precipitación con alcoholes.

- qRT-PCR con Cobas AMPLICOR™ 2.0



- Rango dinámico de linealidad:
600 a 700.000 UI/ml
(2,77 a 5,84 \log_{10})

- Incubación de muestras y estándares externos con un reactivo de lisis para la liberación del ARN y posterior hibridación con sondas de captura.

- b-DNA con Analizador Bayer 340



- Rango dinámico de linealidad:
615 a 7.700.000 UI/ml
(2,78 a 6,88 \log_{10})

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

- Se consideraron aceptables las diferencias menores o iguales a $0,5 \log_{10}$.
- Para el estudio comparativo se tomaron como referencia los valores obtenidos con Cobas amplificador HCV Monitor v2.0.
- Para el análisis de los controles se tuvo en cuenta la evaluación emitida por el College of American Pathologists.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

MUESTRAS

- ✓ Total de sueros positivos: 50
- ✓ Total de sueros negativos: 28

Teniendo como referencia los valores obtenidos con Cobas amplificador HCV Monitor v2.0 hubo un 100% de coincidencia entre ambas técnicas.

✓ En 17 muestras se determinó el valor absoluto de carga viral por ambos métodos.

Como puede verse en el gráfico 1, en general existe una subestimación del valor de cuantificación del bDNA respecto a la qRT-PCR ($r^2=0,905$).

En 7 sueros la diferencia fue mayor de $0,5 \log_{10}$ pero nunca superior a $1 \log_{10}$.

En 4 muestras con >700.000 UI/ml por qRT-PCR se realizó una dilución 1:10 de la muestra para establecer el valor exacto de CV. Es de destacar que estos 4 sueros tuvieron <700.000 UI/ml por bDNA.

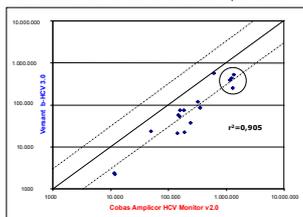


Gráfico 1: La línea central representa la equivalencia perfecta entre qRT-PCR y bDNA, mientras que las dos líneas discontinuas representan el rango de diferencia aceptable ($\pm 0,5 \log_{10}$).

Los 4 casos enmarcados en el círculo son aquellos pacientes con >700.000 UI/ml por qRT-PCR y <700.000 UI/ml por bDNA.

muestra	qRT-PCR Log ₁₀ (x1)	bDNA Log ₁₀ (x2)	diferencia
501	5,13	5,20	0,07
547	5,36	5,39	0,03
557	5,11	5,41	0,30
578	5,39	5,44	0,05

✓ Las 33 muestras positivas restantes tuvieron una CV por encima del límite superior de cuantificación de la qRT-PCR (700.000 UI/ml).

Es de señalar que en este grupo hubo 13 sueros con valores <700.000 UI/ml por bDNA y las diferencias mínimas con qRT-PCR oscilaron entre $0,02$ y $0,54 \log_{10}$:

muestra	qRT-PCR Log ₁₀	bDNA Log ₁₀	Diferencia mínima
508	$> 5,84$	5,79	0,05
515	$> 5,84$	5,59	0,25
536	$> 5,84$	5,57	0,27
537	$> 5,84$	5,48	0,36
542	$> 5,84$	5,58	0,26
550	$> 5,84$	5,82	0,02
553	$> 5,84$	5,73	0,11
556	$> 5,84$	5,54	0,30
563	$> 5,84$	5,54	0,30
566	$> 5,84$	5,52	0,32
569	$> 5,84$	5,30	0,54
572	$> 5,84$	5,44	0,40
574	$> 5,84$	5,64	0,20

CONCLUSIONES

Cobas amplificador HCV Monitor v2.0 y Versant b-DNA HCV 3.0 son herramientas de monitorización de la carga viral igualmente útiles para la toma de decisiones en el tratamiento de la Hepatitis C pero:

➢ Nuestros datos sugieren que las peculiaridades técnicas de ambos métodos en ocasiones impiden establecer una buena correlación entre los resultados, sobre todo en aquellos casos en que las divergencias pueden derivar en importantes modificaciones terapéuticas. Por lo tanto es recomendable que de momento cada médico procure hacer el seguimiento virológico de sus pacientes con la misma técnica.

➢ El proceso de normalización de los métodos moleculares para la cuantificación de ARN del Virus de la Hepatitis C no ha concluido.

CONTROLES

En el control de calidad del CAP (HCVN-B 2006) participaron más de 80 laboratorios. En las tablas 2 y 3 se muestra la comparación de la CV por qRT-PCR y por bDNA, así como las estadísticas de nuestra evaluación.

Tabla 2

Control	qRT-PCR Log ₁₀ (x1)	bDNA Log ₁₀ (x2)
HCV-06	5,07	5,31 5,20
HCV-07	5,53	5,30 5,60
HCV-08	$< 2,77$	$< 2,78$ $< 2,78$
HCV-09	4,33	4,16 4,25
HCV-10	$< 2,77$	$< 2,78$ $< 2,78$

Tabla 3

Control CAP	qRT-PCR Log ₁₀ Echevarne	Media CAP	S.D.	S.D.I.	LABS.
HCV-06	181.500 (5,25 \log_{10})	156.982,5 (5,19 \log_{10})	48.543,7	+0,5	83
HCV-07	4.065 (3,61 \log_{10})	3.118,8 (3,49 \log_{10})	1.127,6	+0,8	84
HCV-08	< 600 (2,77 \log_{10})	< 600 (2,77 \log_{10})	-	-	1
HCV-09	24.250 (4,39 \log_{10})	15.716,5 (4,19 \log_{10})	4.823,5	+1,8	84
HCV-10	< 600 (2,77 \log_{10})	< 600 (2,77 \log_{10})	-	-	1

➢ Aunque en general hubo concordancia entre los valores de cuantificación obtenidos en ambos ensayos, desde el punto de vista técnico las diferencias superiores a $0,5 \log_{10}$ se consideran inaceptables.

➢ Si nos basamos en la regla de los 2 \log_{10} , las divergencias detectadas (que en todos los casos ha sido menor que $1 \log_{10}$) no conducirían a un cambio de terapia (gráfico 1).

➢ En cambio, si se siguieran las normas de algunas guías médicas que se basan en un valor de corte de 700.000 u 800.000 UI/ml para instaurar un tratamiento más o menos agresivo, en los 17 casos con CV >700.000 UI/ml por Cobas amplificador HCV Monitor v2.0 y <700.000 UI/ml por Versant b-DNA HCV 3.0, se tomarían decisiones terapéuticas contrapuestas e incorrectas en perjuicio del paciente (gráfico 1 y tabla 1).

➢ En nuestra opinión, la total automatización de los métodos de cuantificación ayudaría en gran medida a la normalización de los resultados.

➢ Asimismo, es necesario abordar técnicas más sensibles y con un amplio rango de linealidad que integren en un mismo ensayo las determinaciones cualitativa y cuantitativa.

REFERENCIAS

- NIH Consensus and State-of-the-Science-Statements 2002; 19 (3):1-47 (disponible en: <http://consensus.nih.gov>).
- Alberti A, Clumeck N, Collins S, Gerlich W, Lundgren J, Palù G, Reiss P et al. J. Hepatol. 2005; 42: 615-24.
- Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Hepatology 2000; 32: 654-9.
- Scott JD, Gretch DR. J. American Med. Association 2007; 297(7): 724-32 (disponible en: www.jama.com).
- Scott JD et al. Clin Infect Dis 2006; 42: 945-52.