

**"DESARROLLO DE UNA MOLÉCULA DE ARN UTILIZADA COMO
CONTROL INTERNO EN PCR PARA LA DETECCIÓN DEL ARN
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C Y DE LA INMUNODEFICIENCIA
HUMANA TIPO 1 EN MUESTRAS BIOLÓGICAS"**

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS QUÍMICAS

LIC. GONZALO RAMÓN RODRÍGUEZ LOMBARDI

Director de tesis: Dra. Susana Genti-Raimondi



Departamento de Bioquímica Clínica
CIBICI - CONICET
Facultad de Ciencias Químicas
Laboratorio de Hemoderivados
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

Córdoba, 2 de agosto de 2013

A mis amores, María y Victoria

A mis padres, Sole y Juan

AGRADECIMIENTOS

En el transcurso del tiempo dedicado a esta carrera de posgrado he conocido personas que han marcado pequeños puntos en mi vida profesional pero que constituyen eventos únicos e irrepetibles en el aspecto humano. La posibilidad de pertenecer a esta Universidad tan prestigiosa ha sido causa de ello, por lo que este hecho es uno de mis prodigios. Creo que la mayor satisfacción de cualquier profesional formado en esta casa de estudios es la de tener la posibilidad de retribución hacia la misma y hacia la sociedad.

Es gratificante recordar que hace aproximadamente 13 años formaba parte de una promoción de estudio que cursaba una nueva asignatura de la Facultad de Ciencias Químicas, la que fue determinante en mi orientación vocacional. Hoy, este trabajo es uno de los resultados de ese proceso. En este sentido, mis agradecimientos a Graciela Panzetta-Duttari, por darme las herramientas y recursos necesarios, así como también sus vastos conocimientos de manera tan pedagógica.

Agradezco especialmente a quien me eligió para trabajar a su lado, mi jefa Susana Vitali, quien me guía continuamente de manera íntegra y profesional en las actividades laborales diarias, en un laboratorio del cual siento orgullo de formar parte.

A mi directora de tesis, Susana Genti-Raimondi, eternamente agradecido por tanto apoyo y paciencia en estos años, por ser un ejemplo en excelencia académica y brindarme grandes conocimientos, determinantes en mi formación.

Agradezco mucho a Luciana Reyna, de quien recibí un gran aporte en conocimientos técnicos, a mis compañeros de trabajo del área de DPP del Laboratorio de Hemoderivados por el apoyo y compañía, especialmente a Marcela Martínez por instruirme en PCR y a Federico Farías por su colaboración en albúmina sérica humana.

Gran agradecimiento a los directivos del Laboratorio de Hemoderivados y de la Facultad de Ciencias Químicas por generar los convenios interinstitucionales necesarios para cumplir los objetivos de este trabajo.

Gracias a mis queridos padres, que entregaron tanto de sus vidas para que pueda lograr mi realización profesional y crecimiento espiritual.

Finalmente, el más íntimo agradecimiento a mis dos compañeritas de vida, quienes constituyen mi fortaleza espiritual.

Director de Tesis: Dra. Susana Genti-Raimondi

Comisión de Tesis: Mgter. María Susana Vitali
Dra. Silvia Nates

Comisión Evaluadora: Mgter. María Susana Vitali
Dra. Silvia Nates
Dr. Eduardo Cecarelli

ÍNDICE

Pág.

1	ABREVIATURAS
3	GLOSARIO
5	RESUMEN
9	INTRODUCCIÓN
10	I- Terapia transfusional
10	Ia- Sangre, plasma y hemoderivados
11	Ib- Riesgo biológico asociado a la terapia por hemoderivados: agentes infecciosos virales transmisibles
13	Ic- Seguridad biológica asociada a la producción de hemoderivados
22	II- Virus de la Hepatitis C y Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1
22	IIa- Virus de la Hepatitis C (VHC)
26	IIb- Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1(VIH-1)
27	III- Técnicas basadas en la Amplificación de Ácidos Nucleicos (NAT)
27	IIIa- Generalidades
28	IIIb- Validación de NAT para la detección del ARN del VHC en mezclas de plasma humano
28	i- Límite de detección
29	ii- Especificidad
29	iii- Robustez
29	1- <i>Acondicionamiento de muestras y controles</i>
30	a- Controles externos
30	i- Control positivo
30	ii- Control negativo
30	iii- Control de reactivo
30	b- Control Interno (CI)
31	2- <i>Extracción del ácido nucleico</i>
31	3- <i>Retrotranscripción (obtención del ADNc)</i>
32	4- <i>Amplificación del ADN</i>
34	5- <i>Detección-caracterización y/o cuantificación del producto de amplificación</i>

Pág.	
34	6- Interpretación y registro de los resultados
34	i- Resultado positivo de una muestra
35	ii- Resultado negativo de una muestra
35	iii- Resultado inválido de una muestra
35	7- Análisis estadístico
35	8- Aseguramiento de la Calidad
35	IIIc- Detección del ARN/VHC y ARN/VIH-1 por NAT: técnicas disponibles
40	IIIId- Uso del Control Interno en PCR para la detección del ARN/VHC y ARN/VIH-1
44	OBJETIVOS
45	MATERIAL Y MÉTODOS
46	I- Construcción del Control Interno
46	Ia- Obtención del ADNdc molde de 258pb (ADN-258) de una secuencia ubicada en la región 5' no codificante del ARN del VHC.
47	Ib- Clonación del fragmento amplificado correspondiente al ADN-258 (TOPO-258).
47	Ic- Diseño y síntesis de la molécula de ADN doble cadena (ADNdc) de 52 pb (ADN-52).
48	Id- Clonación del ADN-52 en TOPO-258 (TOPO-310).
49	Ie- Síntesis del ARN del CI
50	i- Cuantificación del CI
51	ii- Almacenamiento del CI
51	iii- Estabilidad del CI
51	II- Implementación del Control Interno en las técnicas de PCR "in house"
51	IIa- Determinación de la concentración de trabajo de la solución de CI
52	IIb- Detección de ARN/VHC en plasma humano
52	IIc- Validación de Nested-PCR/VHC
53	i- Límite de detección

Pág.	
53	ii- Especificidad
53	iii- Robustez
54	IId- Detección de los genotipos del VHC
54	IIE- Detección de ARN/VHC en Hemoderivados: Albúmina Sérica Humana (ASH)
54	IIf- Detección de ARN/VIH-1 en plasma humano
55	IIG- Validación de Nested-PCR/VIH-1
55	i- Límite de detección
55	ii- Especificidad
56	iii- Robustez
56	IIh- Detección de los genotipos del VIH-1
56	IIi- Detección de ARN/VIH-1 en Hemoderivados
56	i- Antitrombina III (ATIII) y Gammaglobulina Antitetánica Intramuscular (GA)
56	ii- Complejo Protrombínico (CPR) y Gammaglobulina Endovenosa Líquida (IVL)
57	IIj- Detección simultánea del ARN/VHC y ARN/VIH-1 en plasma humano
58	RESULTADOS
59	I- Análisis de calidad de la molécula de ARN/CI
59	Ia- Presencia del ARN/CI específico
60	Ib- Ausencia del ADN molde
60	Ic- Cuantificación del CI
62	Id- Almacenamiento y Estabilidad del CI
62	II- Implementación del Control Interno en las técnicas de PCR "in house"
62	IIa- Determinación de la concentración de trabajo de la solución de CI
64	IIb- Detección de ARN/VHC en plasma humano
65	IIc- Validación de Nested-PCR/VHC

<i>Pág.</i>	
65	i- Límite de detección
65	ii- Especificidad
66	IIId- Detección de los genotipos del VHC
66	IIe- Detección de ARN/VHC Hemoderivados: Albúmina Sérica Humana (ASH)
68	IIIf- Detección de ARN/VIH-1 en plasma humano
68	IIg- Validación de Nested-PCR/VIH-1
69	i- Límite de detección
69	ii- Especificidad
69	IIIf- Detección de los genotipos del VIH-1
70	IIi- Detección de ARN/VIH-1 en Hemoderivados
70	i- Antitrombina III (ATIII) y Gammaglobulina Antitetánica Intramuscular (GA)
71	ii- Complejo Protrombínico (CPR) y Gammaglobulina Endovenosa Líquida (IVL)
71	IIj- Detección simultánea del ARN/VHC y ARN/VIH-1 en plasma humano
73	III- Aseguramiento de la Calidad en las técnicas desarrolladas
76	IV- Algoritmo de trabajo para el manejo de resultados obtenidos por PCR
77	V- Armonización de las técnicas de PCR en el Laboratorio de Hemoderivados
80	DISCUSIÓN
89	ANEXO
97	BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico copia

ARN: ácido ribonucleico

ASH: albumina sérica humana

ATIII: antitrombina III

cbm : calidad biología molecular

CI: control interno

CN: control negativo

CPMP: Committee for Proprietary Medicinal Products ó Comité para los Propietarios de Productos Médicos

CP: control positivo

CPR: complejo protrombínico

dNTP's: desoxirribonucleótidos trifosfato

EAEMP: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products

ECBS: Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS

EDQM: European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care

EIA: enzimoimmunoanálisis

FA: Farmacopea Argentina

FDA: Food and Drug Administration

FE: Farmacopea Europea

FVIII: Factor VIII

FIX: Factor IX

GA: gammaglobulina antitetánica intramuscular

HD: hemoderivados

IVL: gammaglobulina endovenosa líquida

LHD: Laboratorio de Hemoderivados

NAT: técnicas de amplificación de ácidos nucleicos

NIBSC: National Institute for Biological Standards and Control ó Instituto Nacional para el Control y Estándares Biológicos

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: PCR a tiempo real

rNTP's: ribonucleótidos

RT: transcripción reversa

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa posterior a la transcripción reversa

SI: estándar internacional

USP: Farmacopea Americana

VHC: virus de la hepatitis C

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

VHB: virus de la hepatitis B

WFH: World Federation of Hemophilia ó Federación Mundial de la Hemofilia

GLOSARIO

ADN polimerasa o Taq polimerasa (*Thermus Aquaticus*): hace referencia a una enzima termoestable que cataliza la reacción de PCR.

Amplicón: producto de amplificación de una PCR.

Cebadores, cebadores iniciadores, oligonucleótidos iniciadores o primers: oligonucleótidos específicos naturales o sintéticos que se unen de manera complementaria a una secuencia diana, participando de manera determinante en el inicio de la reacción de amplificación de la misma.

Oligonucleótidos: secuencia de ADN compuesta generalmente por 15 a 30 bases.

Oligonucleótidos "antisense", "reverse", "antisentido": oligonucleótidos de polaridad negativa respecto de la dirección 5'-3' de la hebra de ADN molde.

Oligonucleótidos "sense", "forward", "sentido": oligonucleótidos de polaridad positiva respecto de la dirección 5'-3' de la hebra de ADN molde.

M-MLV (Moloney murine leukemia virus): hace referencia a un tipo de transcriptasa reversa.

Región 5'NC ó 5' UTR: zona no codificante perteneciente al genoma del VHC que se ubica en el extremo 5' de la hebra, es altamente conservada en cuanto a la variabilidad genética entre los distintos genotipos.

RT: Transcripción Reversa, reacción en la cual se sintetiza ADN copia (ADNc) en base a una hebra molde de ARN.

Secuencia diana o blanco: designa a una secuencia de ácido nucleico de hebra simple o doble que constituye parte de la estructura genómica de alguna especie biológica y que puede ser detectada, identificada y/o cuantificada mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

Seroconversión: refiere a un cambio en el resultado de una prueba serológica de negativa a positiva, que indica el desarrollo de anticuerpos en respuesta a la presencia de un antígeno. La seroconversión también puede ser de positiva a negativa. En este caso se refiere a la primera definición.

PCR simple: se puede definir como una PCR que es diseñada para detectar y/o identificar una sola especie de ácido nucleico en un mismo ensayo.

PCR múltiple ("multiplex" PCR): se puede definir como una PCR que es diseñada para detectar y/o identificar más de una especie de ácido nucleico en un mismo ensayo.

Termociclador: instrumental diseñado para realizar las reacciones en ciclo que comprende la amplificación por PCR.

Transcriptasa inversa: enzima que cataliza la reacción en que se sintetiza ADN copia (ADNc) en base a una hebra molde de ARN.

Técnicas o métodos "in-house": técnicas o métodos basados en el desarrollo de tipo no comercial.

RESUMEN

La transmisión de enfermedades infecciosas por transfusiones de sangre es un riesgo conocido desde hace varias décadas, diferentes eventos en gravedad y frecuencia de transmisión fueron asociados a la sangre y sus derivados. Dichos acontecimientos generaron la necesidad de implementar medidas orientadas a incrementar la seguridad de las transfusiones sanguíneas y de los productos derivados del plasma. La utilización de técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (NAT) para la detección de virus transmisibles por vía sanguínea, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ha permitido disminuir significativamente el margen en el riesgo residual biológico debido a que las mismas permiten detectar de forma directa y más temprana el agente infeccioso respecto de las técnicas serológicas comúnmente empleadas. Los virus principalmente asociados a transmisión por hemoderivados (HD) son el virus de la hepatitis C (VHC), virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), virus de la hepatitis B (VHB), parvovirus humano B19 (B19) y virus de la hepatitis A (VHA), entre otros.

Una de las condiciones imprescindibles para garantizar la calidad de un resultado obtenido por PCR es la incorporación de un **Estándar Interno o Control Interno (CI)** que permita monitorear la presencia de resultados falsos negativos y detectar los resultados verdaderos negativos.

En este trabajo de Tesis se describe el diseño y desarrollo de un CI de tipo ARN (ARN/CI) aplicado a la detección del ARN del VHC (ARN/VHC) en plasma y HD mediante una RT-Nested-PCR *in house* competitiva (**Nested-PCR/VHC**). Además, se describen las condiciones metodológicas óptimas para la utilización del mismo en la detección del ARN del VIH-1 (ARN/VIH-1) en plasma y HD mediante una RT-Nested-PCR *in house* no competitiva (**Nested-PCR/VIH-1**), así como también en la detección simultánea de ambos virus en un mismo ensayo mediante una RT-Nested-PCR múltiple *in house* (**multiplex Nested-PCR/VHC+VIH-1**).

El CI es una molécula quimérica de ácido ribonucleico compuesta por una secuencia perteneciente a la región 5' no codificante (5'NC) del genoma del VHC y por otra perteneciente a una secuencia de diseño único, insertada en la anterior.

Las condiciones experimentales de aplicación han sido optimizadas para que el CI sea adicionado al inicio del ensayo con el propósito de detectar resultados falsos negativos mediante el seguimiento de las etapas de extracción, purificación, retrotranscripción, amplificación, detección e identificación de los ácidos ribonucleicos virales mencionados.

Adicionalmente, se establecieron las condiciones óptimas de almacenamiento del CI, así como también las condiciones experimentales requeridas para su aplicación en plasma humano y derivados plasmáticos.

El impacto del desarrollo tecnológico propuesto es de relevancia debido al bajo costo y complejidad requeridos, tanto para la síntesis y almacenamiento del CI, como para su implementación en las técnicas mencionadas, en comparación con las técnicas comerciales disponibles en el mercado. La calidad de la molécula sintética, la adaptación a técnicas de PCR para la detección simple y simultánea de ácidos ribonucleicos virales, la versatilidad de aplicación en diversas matrices biológicas, los bajos requerimientos económicos y los altos beneficios en materia analítica, permiten disponer de un reactivo esencial y accesible para el aseguramiento de la calidad de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

ABSTRACT

The transmission of infectious diseases through blood transfusions is a known risk for several decades. Different events in the severity and frequency of transmission were associated with blood and its derivatives. These events led to the need to implement measures to increase the safety of blood transfusions and plasma-derived products. The use of techniques based on the amplification of nucleic acids (NAT), as the chain reaction of the polymerase (PCR), applied to the detection of blood-borne transmissible virus, allowed to significantly reduce the margin in the biohazard waste. This is because they allow direct and early detection of the infectious agent on the serological techniques commonly employed. The hepatitis C virus (VHC), the immunodeficiency human type 1 virus (VIH-1), the hepatitis B virus (VHB), the human parvovirus B19 (B19) and the hepatitis A virus (VHA), are mainly associated with viruses transmission by blood products (HD) among others. One of the necessary conditions to guarantee the quality of a result obtained by PCR is the addition of an **Internal Standard or Internal Control** (CI) that allows to monitor the presence of false-negative results and to detect true-negative results.

This work describes the design and development of a RNA-Internal Control (ARN/CI) applied to the detection of RNA-HCV (ARN/VHC) in plasma and HD through a competitive in-house Nested-PCR after reverse transcription (RT) reaction (**Nested-PCR/VHC**). In addition, it has been adapted for the detection of RNA-HIV-1 (ARN/VIH-1) in plasma and HD through a non-competitive in-house RT-Nested-PCR (**Nested-PCR/VIH-1**). Furthermore, the simultaneous detection of both viruses in a same test using a multiplex RT-Nested-PCR (*multiplex Nested-PCR/VHC+VIH-1*) was carried out. The CI is a chimerical molecule of RNA consisting of a sequence belonging to the 5' non-coding region (5' NC) of the genome of HCV and of a sequence of unique design inserted in the previous sequence of RNA. The experimental conditions have been optimized so that the CI is added at the beginning of the trial. This allows us to detect the presence of false-negative results by tracking

the stages of extraction, purification, retrotranscription, amplification, detection and identification of the mentioned viral ribonucleic acid.

Additionally, conditions of storage of the CI as well as the special conditions for its application in human plasma and plasma derivatives were optimized. The impact of the proposed technological development is of great importance due to the low cost and complexity required for synthesis and storage of the CI, as well as for its implementation in the above mentioned techniques, compared to the commercial techniques available on the market. The quality of the synthetic molecule, adaptation to PCR techniques for simple and simultaneous detection of viral ribonucleic acid, the versatility in the implementation for various biological matrices, the low economic requirements and the high profits in the analytical field, provide an essential and available reagent, to the quality assurance in nucleic acid amplification techniques.

INTRODUCCIÓN

I- TERAPIA TRANSFUSIONAL

Ia- Sangre, plasma y hemoderivados

La terapia transfusional tiene por objeto restaurar un estado fisiológico que ha sido alterado y restablecerlo a sus condiciones normales. La misma puede realizarse mediante la aplicación de sangre total o sus componentes (sangre carente de leucocitos, glóbulos rojos congelados, concentrados de plaquetas, concentrados de leucocitos, etc.), o bien mediante la aplicación de una proteína carente o disminuida (terapia de componentes o hemoderivados) en ciertas enfermedades, especialmente en las relacionadas con la homeostasis de la coagulación. Los hemoderivados (HD) son concentrados de proteínas plasmáticas de interés terapéutico para la salud humana que no pueden sintetizarse por métodos convencionales; son generados mediante procesos tecnológicos de fraccionamiento del plasma humano y purificación de proteínas. La producción de los mismos representa sin duda el avance más sólido y revolucionario de la terapia transfusional (Harris 1990). En la década del 40, el método de fraccionamiento etanólico desarrollado por Cohn/Oncley fue determinante para fundar las bases de los principios tecnológicos que se emplean en la actualidad para la separación y purificación de proteínas plasmáticas (Cohn, Oncley et al. 1944; Cohn 1946; Cohn, Strong et al. 1946; Oncley, Melin et al. 1949; Burnouf 1995). Mediante estos procedimientos es posible extraer los componentes biológicos proteínicos del plasma con alta especificidad, selectividad y pureza, conservando las propiedades biológicas nativas de los mismos.

El proceso de purificación se realiza a partir de grandes mezclas de plasma (>1.000 donantes sanos), denominadas comúnmente "*pools*" de plasma. Algunos productos que son obtenidos mediante el fraccionamiento del plasma humano son: inmunoglobulinas poliespecíficas, comúnmente aplicadas en inmunodeficiencias y enfermedades autoinmunes; inmunoglobulinas hiperinmunes (anti-tetánica, anti-antígeno Rho, anti-VHB, anti-varicela); factores de la coagulación (factor VIII -FVIII-

factor IX -FIX-, anti-trombina III -ATIII-, fibrinógeno, etc.), aplicados a enfermedades del sistema de la coagulación, desórdenes hemorrágicos y enfermedades hepáticas; albúmina y biomateriales ("*fibrin glue*"); entre otros.

Ib- Riesgo biológico asociado a la terapia por hemoderivados: agentes infecciosos virales transmisibles

La transmisión de enfermedades infecciosas virales a través de la sangre, sus componentes y derivados, ha sido uno de los principales obstáculos para la medicina transfusional desde su desarrollo en la segunda mitad del siglo XX. La materia prima necesaria para producir un derivado plasmático está sujeta a ciertos riesgos de contaminación por agentes patógenos, especialmente de tipo viral, que potencialmente pueden afectar la seguridad biológica del mismo. Para producir HD a escala industrial es necesario conformar grandes mezclas de plasma, por lo que existe la probabilidad de que una unidad de plasma con alto título viral pueda contaminar a toda la mezcla y, por consiguiente, generar un riesgo de transmisión iatrogénica. La probabilidad de que ello ocurra depende principalmente de ciertos factores asociados a los virus (características fisicoquímicas, carga viral, tiempo de fase virémica, características epidemiológicas asociadas, etc.), condiciones del huésped (estado inmunológico) así como también de características propias del medicamento (copurificación de anticuerpos neutralizantes en producto final). En relación a los agentes infecciosos transmisibles por sangre, son relativamente pocos los virus potencialmente transmisibles por derivados plasmáticos (Modrow, Wenzel et al. ; Dietrich, Mosley et al. 1990; Harris 1990; Coste, Reesink et al. 2005; Allain, Stramer et al. 2009; Roth, Busch et al. 2012):

- 1-Virus de la hepatitis C (VHC)
- 2-Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1)
- 3-Virus de la hepatitis B (VHB)
- 4-Parvovirus humano B19 (B19)
- 5-Virus de la hepatitis A (VHA)
- 6-Virus de la hepatitis E (VHE)

Son vastos los casos descritos de transmisión de enfermedades virales asociadas a transfusiones sanguíneas y HD. Previo a la introducción de los métodos de inactivación viral un elevado porcentaje de pacientes hemofílicos que recibieron tratamiento con concentrados plasmáticos desarrolló infección por VHB y VHC (Hernandez and Tusell 1996). Se han descrito numerosos eventos de transmisión de hepatitis B y C, así como también de VIH-1, mediante concentrados de factores de la coagulación (FVIII y FIX) tratados con calor seco como método de inactivación viral (Colombo, Mannucci et al. 1985; Preston, Hay et al. 1985; Mariani, Ghirardini et al. 1987; Lush, Chapman et al. 1988; Blanchette, Vorstman et al. 1991; Pistello, Ceccherini-Nelli et al. 1991; Hernandez and Tusell 1996). Desde la aparición del VIH en la década de 1980 los efectos en la comunidad de hemofílicos que recibieron factores de la coagulación fueron devastadores; las primeras evidencias de transmisión de VIH en hemofílicos se registraron en 1982, fundamentalmente en pacientes tratados con FVIII (MMWR 1982; Dietrich 1990; Dietrich, Mosley et al. 1990; Remis, O'Shaughnessy et al. 1990; Williams, Skidmore et al. 1990). Algunos estudios demostraron casos de infección por VHC en mujeres que habían recibido tratamiento con gammaglobulina anti-Rho (Lawlor and Columb 1999; Smith, Lawlor et al. 1999) así como también casos de transmisión del VHC por inmunoglobulina endovenosa obtenida sin etapa de inactivación viral (James and Mosley 1995; Bresee, Mast et al. 1996; Echevarria, Leon et al. 1996). Otros autores reportaron un gran número de lotes de inmunoglobulinas contaminados con ARN/VHC (Yu, Mason et al. 1994). A pesar de ello, en contraste a los factores de la coagulación, los productos relacionados con inmunoglobulinas y albúmina fueron en general más seguros (Bremard-Oury, Aucouturier et al. 1986; Harris 1990; Schiff 1994).

No es frecuente la transmisión por HD de aquellos virus que están normalmente asociados a células como el citomegalovirus, virus de Epstein Barr y virus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV) debido a que la presencia de los mismos en plasma libre de células es poco probable.

Otras enfermedades no tan comunes son consideradas como factor de estudio en la terapia transfusional. Este es el caso de la transmisión del prión asociado a la variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jacob por transfusión de hematíes; si bien

se han descrito tres casos clínicos confirmados en Reino Unido (Llewelyn, Hewitt et al. 2004; Peden, Head et al. 2004; Peden and Ironside 2004; Hewitt, Llewelyn et al. 2006; Surveill 2006; Surveill 2007), el riesgo de transmisión por HD parece ser menor debido al efecto de dilución de las grandes mezclas de plasma. No obstante, no se descarta la posibilidad de transmisión de la enfermedad mediante productos derivados del plasma (Operskalski and Mosley 1995). Otros de los virus denominados emergentes, como el caso del West Nile Virus, Corona Virus y Monkeypox Virus, están siendo estudiados con el propósito de establecer medidas profilácticas.

Afortunadamente y como consecuencia de la implementación de una serie de medidas de seguridad que se aplican actualmente en la industria farmacéutica, la magnitud del riesgo biológico asociado a HD ha ido decreciendo gradualmente en los últimos años.

Ic- Seguridad biológica asociada a la producción de hemoderivados

Dos de los objetivos dominantes para la industria fraccionadora de plasma son la seguridad biológica y el alto rendimiento en la purificación (Buchacher and Iberer 2006). Acorde a ello, los atributos que imprescindiblemente debe poseer un HD son: **seguridad, calidad y tolerancia clínica**.

La seguridad y calidad de los HD dependen del cumplimiento de requerimientos específicos de calidad establecidos mediante normativas, guías y recomendaciones, emitidas por numerosos organismos reguladores nacionales e internacionales, de los cuales se puede citar:

- Farmacopea Europea (FE; EDQM, <https://www.edqm.eu>).
- Farmacopea Argentina (FA, <http://www.anmat.gov.ar>).
- Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT).
- Organización Mundial de la Salud (OMS, <http://www.who.int>).
- Organización Panamericana de la Salud (OPS).
- Farmacopea Americana (USP, <http://www.usp.org/>).

- Agencia Europea para la Evaluación de los Productos Medicinales (EAEMP)
- Comité para los Propietarios de Productos Médicos (CPMP).
- Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH, <http://www.ich.org/>).

En Argentina, **ANMAT** (disposición **2819/2004**) reglamenta las normas generales para la producción de HD de origen plasmático y establece la Guía de Inspecciones para la industria de medicamentos de origen biológico. A nivel internacional, el Laboratorio de Hemoderivados (LHD) está sujeto a las guías de FE.

La calidad de un producto derivado del plasma está ligado principalmente a dos niveles de seguridad (Zucchi 2005):

- ✓ Aseguramiento de la calidad del plasma proveniente del banco de sangre para ser empleado como materia prima en la industria farmacéutica.
- ✓ Aseguramiento de la calidad de los medicamentos elaborados en la industria farmacéutica.

El plasma empleado como materia prima proviene de donantes reclutados por bancos de sangre certificados bajo un estricto cumplimiento de normas de calidad, principalmente de las Buenas Prácticas de Laboratorio y Buenas Prácticas de Fabricación y Control (Marey, Coupey et al. 1997; Roussel 1997; Wagstaff 1998). En este sentido, la selección del donante se realiza en base a estrategias protocolizadas que permiten definir la calidad de la sangre y por ende, del plasma destinado a la producción de HD. Una de ellas se relaciona con la evaluación inicial del donante, consistente en una completa anamnesis y examen clínico realizados por el médico, mediante los cuales es posible detectar individuos en estado de riesgo. La otra reside en el tamizaje de laboratorio realizado en las muestras correspondientes a los donantes. Actualmente, la seguridad en los bancos de sangre de Argentina se fundamenta en la donación voluntaria no remunerada, la selección y el control serológico de cada unidad de sangre para los siguientes marcadores virales: antígeno de superficie del VHB-AgsVHB-, anticuerpos anti-VHC y anti-VIH 1 y 2. Sólo el

plasma que resulta negativo para esos marcadores puede ser empleado en la industria farmacéutica.

Por otra parte, el Aseguramiento de la Calidad en la industria farmacéutica incluye:

- 1- Empleo de plasma apto certificado por banco de sangre.
- 2- Re-análisis de los mismos marcadores virales en los *pooles* de plasma a procesar (y en producto final, lo cual es opcional).
- 3- Análisis de marcadores virales por técnicas de biología molecular.
- 4- Aplicación de un adecuado proceso de purificación proteica en la elaboración de HD.
- 5- Seguimiento de las Normas de Buenas Prácticas de Fabricación y Control.
- 6- Incorporación al proceso productivo de métodos de inactivación viral validados.

Si bien el tamizaje serológico en las donaciones de sangre (bancos de sangre) y *pooles* de plasma (industria farmacéutica) ha contribuido de manera productiva a mejorar la seguridad, no es nulo el riesgo asociado a la transmisión de enfermedades infecciosas virales. En líneas generales se puede decir que son al menos cuatro las causas principales que podrían explicar la existencia de un riesgo residual asociado a las donaciones (Kleinman, Busch et al. 1997; Kleinman and Busch 2000; Romero 2008; Kleinman, Lelie et al. 2009):

- ✓ Que el donante se encuentre en una fase inicial de infección, durante el denominado periodo de ventana serológica.
- ✓ La existencia de donantes infectados que son portadores crónicos, clínicamente asintomáticos, no detectados por las pruebas serológicas.
- ✓ La existencia de agentes infecciosos con mutaciones en su genoma, indetectables por las pruebas de tamizaje.
- ✓ Probabilidad de fallas técnicas-operativas de laboratorio en los sistemas de tamizaje (si bien en la actualidad este tipo de error no es frecuente, se estima su valor alrededor de un 0.5 %, Lackritz, Satten et al. 1995).

Dos de los procesos que han permitido mejorar la seguridad en la industria del fraccionamiento del plasma son el fraccionamiento etanólico y la inactivación viral. El tratamiento con etanol en frío durante el fraccionamiento mediante el método de Cohn/Oncley permite contar con una primera barrera que favorece la remoción o inactivación de algunos virus y bacterias (Cohn, Oncley et al. 1944; Cohn, Strong et al. 1946; Oncley, Melin et al. 1949). La implementación de los métodos de inactivación viral específicos en las industrias productoras de HD ha sido un elemento clave para minimizar los riesgos de transmisión por HD asociados a virus presentes en sangre, causando un impacto favorable, especialmente en la seguridad de los productos destinados al tratamiento de la hemofilia (WFH 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la validación e implementación de al menos dos métodos de inactivación para virus envueltos y desnudos en las industrias de fraccionamiento plasmático. En relación a ello, se puede hablar de dos tipos de procesos, la inactivación por muerte del virus y la eliminación o remoción del mismo mediante la purificación proteica o nanofiltración. Son las propiedades físicas y bioquímicas de cada virus las que van a marcar la susceptibilidad hacia los métodos de inactivación o remoción viral (tamaño, la forma, la presencia o ausencia de envoltura basada en membrana de bicapa lipídica y las propiedades agregantes) (Tabla 1).

Tabla 1. Principales características estructurales de los virus asociados a transmisión por HD.

* sc: simple cadena/ dc: doble cadena

Virus	Familia	Tamaño (nm)	Genoma	Envoltura
VHC	Flavivirus	30-60	sc-ARN*	si
VIH-1 y VIH-2	Retrovirus	100	sc-ARN	si
VHB	Hepadnavirus	42	dc-ADN*	si
B19	Parvovirus	18-26	dc-ADN	no
VHA	Picornavirus	27-32	sc-ARN	no

La seguridad de las transfusiones sanguíneas y de los productos derivados del plasma se incrementó aún más como consecuencia de la implementación de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) en bancos de sangre e industrias

productoras de HD para la detección de los virus de transmisión sanguínea. El margen en el riesgo residual como resultado del período de ventana serológica disminuyó significativamente debido a la posibilidad de detectar el virus de manera directa y prematura, en relación a las técnicas serológicas (Busch, Kleinman et al. 2000; Gallarda and Dragon 2000; Kleinman and Busch 2000; Stramer, Glynn et al. 2004; Kleinman, Lelie et al. 2009). La detección directa del ácido nucleico viral constituye una herramienta poderosa en situaciones en las que los análisis serológicos no son aplicables, permitiendo minimizar el riesgo biológico, especialmente en relación a virus transmisibles por sangre. A modo de ejemplo, el período ventana para la infección por VHC es estimado en aproximadamente 82 días (Schreiber, Glynn et al. 2001), por lo que la inclusión de NAT ha permitido reducir ese tiempo hasta 7 a 12 días (Busch 2000; Jackson, Busch et al. 2003; Romero 2008) (Fig. 1). La detección de los anticuerpos contra el VIH mediante enzimoimmunoanálisis (EIA) de tercera generación deja un período ventana de 22 días, mientras que el antígeno p24 es detectable a partir del día 16 y la detección del ARN/VIH es posible entre los 7 y 11 días (Busch 2000; Jackson, Busch et al. 2003) (Fig. 2). En el mismo sentido, NAT permite disminuir el período ventana a 20 días para VHB (Busch 2000; Jackson, Busch et al. 2003). Según autores, en comparación con las técnicas serológicas, NAT permite disminuir el período ventana, siendo de 11, 10 y 39 días para VIH-1, VHC y VHB, respectivamente, cuando se aplican en mezclas de plasma. En líneas generales, el impacto de la inclusión de NAT en el tamizaje de las donaciones de plasma y pools de plasma para fraccionamiento fue mayor para el VHC y VIH respecto de VHB (Velati, Romano et al. 2008).

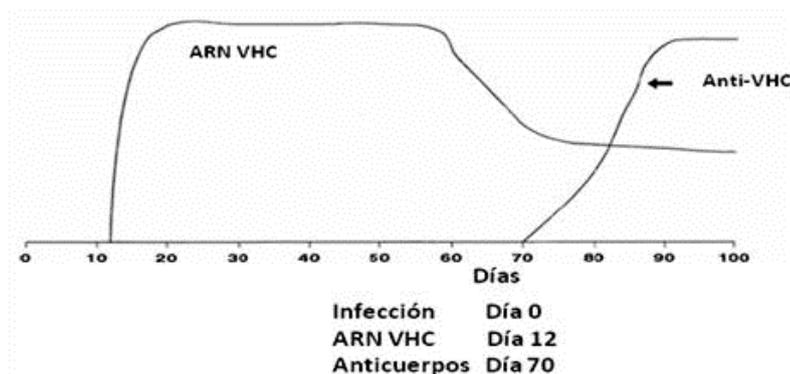


Figura 1. Niveles en plasma de ARN/VHC y anticuerpos anti-VHC post-infección con VHC, adaptada (Busch, Kleinman et al. 2000)

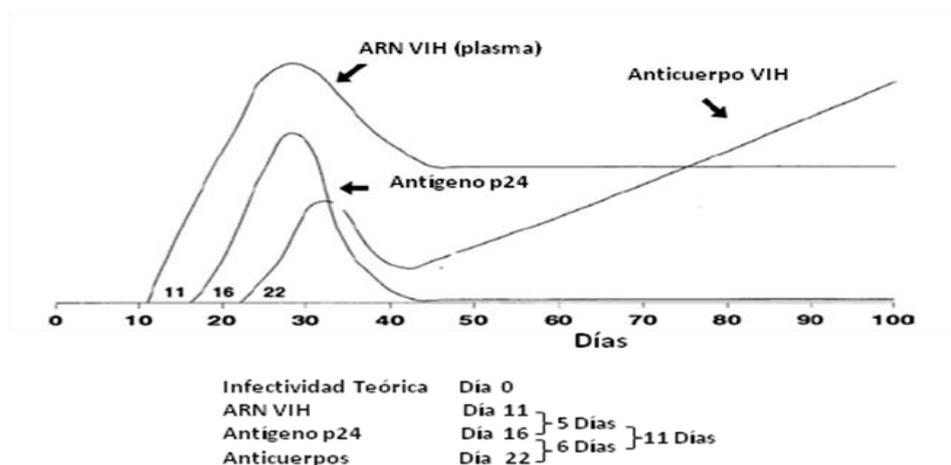
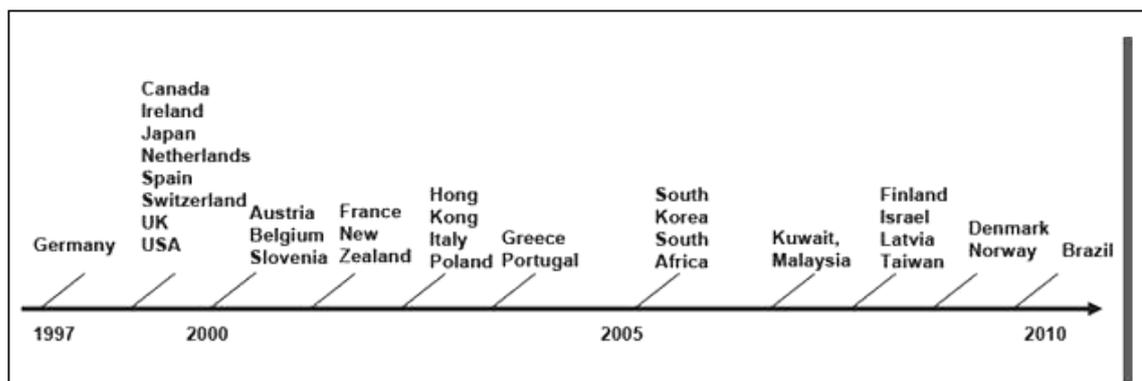


Figura 2. Niveles en plasma de ARN/VIH, antígeno p24 y anticuerpos anti-VIH post-infección con VIH, adaptada (Busch, Kleinman et al. 2000)

La técnica de detección de ácidos nucleicos virales mediante NAT fue introducida inicialmente en 1995 por la Industria del plasma Europea (Coste, Reesink et al. 2005), con el objetivo de reforzar la seguridad de los productos biológicos. Alemania fue pionera en este sentido, implementando la técnica de PCR de manera voluntaria en los bancos de sangre para la detección de tres marcadores virales: VHC, VHB y VIH-1 (Cardoso, Koerner et al. 1999). Subsecuentemente, se fueron incorporando a esta política numerosos países del mundo (Fig. 3A y 3B).

A



B

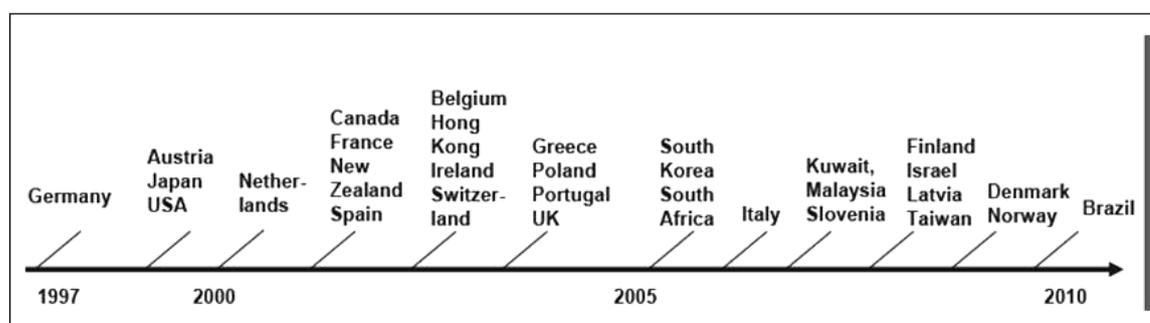


Figura 3. Línea temporal relacionada a la introducción de NAT en algunos países para la detección de VHC (A) y VIH (B), adaptado (Busch 2010).

Desde el año 1999, en Europa se implementa ya de manera obligatoria el análisis por NAT para la detección del ARN/VHC en donaciones de sangre y en mezclas de plasma destinados a fraccionamiento (CPMP 1997; Pisani, Cristiano et al. 2004; Pisani, Marino et al. 2008; EDQM 2012). De acuerdo a estas guías, sólo los productos derivados de pools de plasma humano que hayan sido analizados como "no reactivos" mediante NAT, pueden ser liberados para la comercialización. La implementación de las regulaciones para la detección de los ácidos nucleicos virales para la producción de HD ha sido posible gracias a ciertas políticas generadas desde la OMS, organismo que estableció los primeros estándares internacionales (SI) para una variedad de virus de transmisión por vía sanguínea (Madej, Davis et al. 2010). El primero de ellos fue para ARN/VHC (código NIBSC: 96/790), el cual fue establecido por el Comité de Expertos en Estandarización Biológica de la OMS, (WHO ECBS) en 1997 (Saldanha, Lelie et al. 1999).

Así mismo, en Estados Unidos, la "Food and Drug Administration" (FDA) estableció de manera oficial no sólo la legislación para la detección del ARN/VHC sino también para la detección del ARN/VIH-1 en el tamizaje de los bancos de sangre para la liberación de plasma y componentes celulares sanguíneos para la manufactura (Scribner, Kapit et al. 1994; Delwart, Kalmin et al. 2004). Más allá de las normativas inicialmente impartidas, desde la década del 2000 muchas industrias ya optaron voluntariamente por aplicar NAT para la detección de una amplia gama de virus potencialmente transmisibles por sangre y HD. (Tabla 2).

Tabla 2. Listado de bancos de sangre y laboratorios productores de HD que realizan análisis de "minipool" de plasma por NAT para los principales virus de interés según exigencias y/o políticas comerciales, adaptado (Brooker 2012).

COMPañÍA / LABORATORIO DE FRACCIÓNAMIENTO	TAMAÑO DEL MINIPOL	VIRUS ANALIZADOS POR NAT EN MINI-POOLES	VIRUS ANALIZADOS POR NAT EN POOLES DE PRODUCCIÓN	NAT EN PRODUCTO FINAL
CSL Behring: EU, Alemania	512 o menor	VHA, VHB, VHC, VIH-1, B19	VHA, VHB, VHC, VIH, B19	No
Baxter BioScience: EU, Austria, Italia	512 o menor	VHA, VHB, VHC, VIH-1, B19	VHA, VHB, VHC, VIH 1-2, B19	No
Telecris: EU	96 o 480	VHB, VHC, VIH-1, B19	VHB, VHC, VIH-1, B19	No
Grifols: EU, España, República Checa, Eslovaquia	512 o menor	VHA, VHB, VHC, VIH, B19	VHB, VHC, VIH, B19	
Bio Products Laboratory, UK	512 o menor	VHA, VHB, VHC, VIH 1-2, B19	Requerimientos de Farmacopea Europea (1)	
Biotest: Alemania	960	VHA, VHB, VHC, VIH 1-2, B19	VHB, VHC, VIH	No
Octapharma: Suecia, Austria, Alemania, EU	16-512	VHA, VHB, VHC, VIH-1, B19	Requerimientos de Farmacopea Europea (1)	No
Kedrion: Italia	480 o menor	VHB, VHC, VIH, B19 (VHA si es requerido)	Requerimientos de Farmacopea Europea (1)	
National Bioproducts Institute, Sudáfrica	1 (2) y 216	VHA, VHC, VIH, B19	VHA, VHC, VIH	
Australian Red Cross Blood Service Fractionated at CSL Biotherapies	480/512	VHC, VIH, B19 (3)(opcional)	VHC, VIH, B19 (3)	
Blood Service Group, Singapur Fractionated at CSL Biotherapies	480/512	VHC, VIH (opcional)	VHC, VIH	
Finnish Red Cross BS: Finlandia	1 a 96	VHB, VHC, VIH (individual), VHA, B19 (mini-pool)	FRC BS no realiza pools de plasma	
GreenCross: Corea del Sur	< 450	VHC, VHA	VHA, VHB, VHC, VIH	VHA, VHB, VHC, VIH
Japanese Red Cross: Japón	20	VHB, VHC, VIH-1	VHB, VHC, VIH-1	VHA, VHB, VHC, VIH-1, B19
Shanghai RAAS Blood Products: China	48	VHB, VHC, VIH-1	VHB, VHC, VIH-1	VHB, VHC, VIH-1
Laboratorio de Hemoderivados (UNC): Argentina (4)	500 o menor	VHB, VHC, VIH-1, B19 (3)	VHB, VHC, VIH-1, B19 (3)	VHB, VHC, VIH-1, B19 (3)

1- Farmacopea Europea exige el análisis de VHC por NAT.

2- Desde Octubre de 2005 los ensayos para VHC, VHB y VIH se aplican en donaciones individuales.

3- Aplicable a la producción de Gammaglobulina anti-Rho.

4- Información agregada por autor de este trabajo.

Desde la introducción de NAT en el año 1999 en los bancos de sangre de Estados Unidos y hasta el año 2009, 1 por cada 2 millones de donaciones negativas para anti-VHC resultaron ser positivas para ARN/VHC (66 millones de donaciones)

mientras que 1 por cada 270 mil donaciones negativas para anti-VIH resultaron ser positivas para ARN/VIH (Zou, Dorsey et al. 2010). Stramer y col. demostraron que la implementación de NAT en bancos de sangre de Estados Unidos durante 1999 y 2001 ayudó a prevenir 56 infecciones por VHC y 5 infecciones por VIH anualmente y a reducir el riesgo residual de transfusión por VHC y VIH-1 en aproximadamente 1 en 2 millones (Stramer, Glynn et al. 2004).

Según la legislación nacional argentina el análisis por NAT de los principales marcadores virales en *bancos de sangre* aún no es de carácter obligatorio. Particularmente en la provincia de Córdoba la detección por PCR del ARN/VHC para bancos de sangre es una exigencia. El análisis por NAT en nuestro país es una exigencia para las mezclas de plasma humano destinadas a la *producción de HD* para los siguientes marcadores:

- ARN/VHC para los pools de plasma destinados a todos los productos.
- ADN/Parvovirus B19 para los pools de plasma destinados a la producción de la gammaglobulina anti-Rho.

Es imprescindible mencionar que si bien son considerables los beneficios que otorga la implementación de NAT en bancos de sangre, industrias de HD y laboratorios de análisis clínicos, no reemplazan en absoluto a las técnicas serológicas; la detección de los anticuerpos es tan importante como la detección temprana del ácido nucleico viral. Los niveles de anticuerpos sintetizados pueden ser detectados en cualquier etapa de la vida de una persona (salvo estadios de inmunodepresión primaria o secundaria) mientras que la viremia plasmática es muy fluctuante, pudiendo ser no detectable. Si bien las técnicas serológicas de cribado han mejorado en sus distintas versiones, no han podido aún superar a NAT en cuanto a límite de detección y especificidad, particularmente para la detección del VHC (Laperche, Le Marrec et al. 2003). Consecuentemente, las técnicas mencionadas deben ser consideradas complementarias y no excluyentes.

La selección del donante, el tamizaje de las unidades de sangre mediante el análisis de los principales marcadores virales, la aplicación de los diversos métodos

de fraccionamiento del plasma en forma combinada, los métodos de inactivación viral y principalmente el cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura y Buenas Prácticas de Laboratorio, logradas en base a regulaciones nacionales e internacionales, han sido los componentes fundamentales para optimizar la seguridad biológica de la terapia por derivados plasmáticos. Actualmente, se está trabajando de manera global e integrada para llevar el riesgo biológico a valores cercanos a cero en donde la situación es acorde a lo ideal. Si bien durante los últimos treinta años el mayor esfuerzo en las directivas de seguridad aplicadas a bancos de sangre e industrias de fraccionamiento plasmático han sido orientadas hacia el VHC y VIH, el surgimiento de nuevos virus (Morse and Schluederberg 1990), la aparición de nuevas enfermedades y la fluctuación en la epidemiología de enfermedades ya conocidas, exigen en conjunto una mayor vigilancia y mayor empeño en el desarrollo de nuevos métodos de tamizaje que permitan maximizar la seguridad biológica.

II- Virus de la Hepatitis C y Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1

IIa- Virus de la Hepatitis C (VHC)

El VHC ha sido identificado como el principal agente etiológico causante de hepatitis no A, no B, posterior a transfusiones sanguíneas; el mismo genera infecciones en el 3% de la población mundial (Lavanchy 2009). El virus tiene la capacidad de replicar en hígado y también en tejidos extrahepáticos (Crovatto, Pozzato et al. 2000; Radkowski, Kubicka et al. 2000; Carrozzo, Quadri et al. 2002). La infección por el VHC produce hepatitis aguda con una tendencia muy marcada a la cronicidad y al desarrollo de hepatocarcinoma, así como también cirrosis hepática. Es un virus envuelto de 56-65 nm perteneciente al género *Hepacivirus* de la familia *Flaviviridae* y su estructura y organización genómica es similar a la de los pestivirus y flavivirus con regiones no codificantes (NC ó UTR) 5' y 3' que incluyen un sólo marco abierto de lectura. Su genoma está constituido por una simple hebra de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9.500 nucleótidos (Choo, Richman et al. 1991;

Bukh, Purcell et al. 1992) que codifica para una sola poliproteína cercana a 3.000 aminoácidos. La misma es procesada una vez presente el virus en el huésped dando como producto tres proteínas estructurales importantes (core, E1 y E2) y otras de tipo no estructurales (NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b) necesarias para la replicación viral.

El genoma del VHC exhibe un alto grado de heterogeneidad entre las secuencias de ácidos nucleicos distintos aislados, no obstante es reconocido que entre las zonas más conservadas se encuentran la región 5' NC y las 99 bases finales de la región 3' NC (Bukh, Purcell et al. 1994; Smith, Mellor et al. 1995; Simmonds, Bukh et al. 2005). La región más variable del genoma del VHC es la región hipervariable E2, que al mutar cambia las características antigénicas de la envoltura contribuyendo a la variabilidad antigénica necesaria para evitar la acción de los anticuerpos (Fig. 4 A y B).

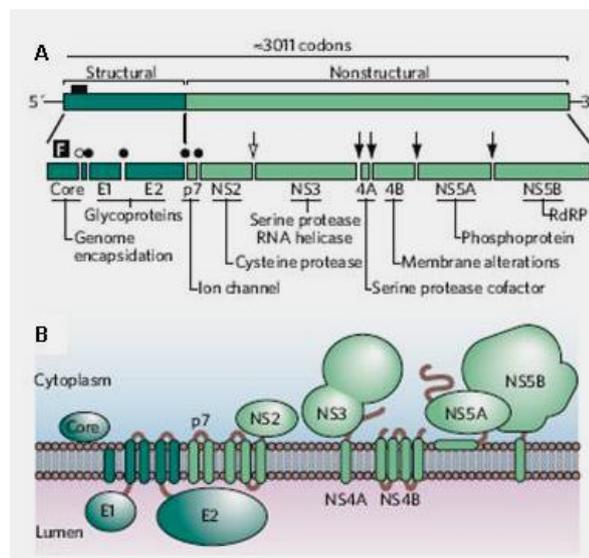


Figura 4. A. Esquema representativo de la estructura del genoma del Virus de la Hepatitis C. El genoma incluye un marco abierto de lectura que codifica para genes estructurales y no estructurales así como también las regiones 5' y 3' NC. Genes que codifican para proteínas estructurales: core, glicoproteína de envoltura 1 (E1), glicoproteína de envoltura 2 (E2). Genes que codifican para proteínas no estructurales (NS): porina hidrofóbica (p7), NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a y NS5b. Se representa abajo el procesamiento de la poliproteína con los sitios de clivaje que dan como producto a las proteínas estructurales y no estructurales del virus. **B.** Topología de las proteínas del VHC respecto a la membrana celular. Adaptada (Lindenbach and Rice 2005).

Basado en el análisis filogenético de secuencias genómicas parciales (región E1/core y NS5b) se ha podido clasificar al VHC en 6 genotipos principales y a su vez, en varios subtipos. Entre los principales genotipos puede existir hasta un 30% de divergencia genómica. Dentro de los subtipos también podemos identificar aislados y cuasiespecies. Se describieron hasta once genotipos distintos y hasta cien subtipos. Numerosos han sido los trabajos que intentaron estandarizar la nomenclatura filogenética hasta que en un consenso, en 2005, se propuso unificar el sistema de nomenclatura para las variantes genotípicas del VHC (Simmonds, Bukh et al. 2005). Según Simmonds, Bukh y col. puede considerarse la siguiente clasificación unificada (Tabla 3):

Tabla 3. Clasificación consenso propuesta para los subtipos/genotipos de VHC, adaptada (Simmonds, Bukh et al. 2005)

Genotipo	Locus / Aislado	Números de acceso
Genotipo 1 • 1a • 1b • 1c	HPCPLYPRE, HPCCGAA HPCJCG, HPCHUMR HPCCGS, AY051292	M62321, M67463 D90208, M58335 D14853, AY051292
Genotipo 2 • 2a • 2b • 2c • 2k	HPCPOLP, JFH-1 HPCJ8G, JPUT971017 BEBE1 VAT96	D00944, AB047639 D10988, AB030907 D50409 AB031663
Genotipo 3 • 3a • 3b • 3k	HPCEGS, HPCK3A HPCFG HPCJK049E1	D17763, D28917 D49374 D63821
Genotipo 4 • 4a	HCV4APOLY	Y11604
Genotipo 5 • 5a	EUH1480, SA13	Y13184, AF064490
Genotipo 6 • 6a • 6b • 6d • 6g • 6h • 6k	HCV12083, 6a33 Th580 VN235 HPCJK046E2 VN004 VN405	Y12083, AY858526 D84262 D84263 D63822 D84265 D84264

Los genotipos 1, 2 y 3 se distribuyen ampliamente en todo el mundo, mientras que el genotipo 4 se encuentra con más frecuencia en oriente medio y África; el genotipo 5 en Sudáfrica y el genotipo 6 en sudeste asiático. El genotipo 3 es el más prevalente en Argentina, mientras que el subtipo 2c es el más prevalente en la

provincia de Córdoba (Re, Culasso et al. 2011). La unificación de un sistema de clasificación genética es importante para el estudio de la epidemiología, evolución y patogénesis del VHC. La identificación genotípica es clínicamente importante debido a la mayor resistencia hacia los tratamientos antivirales con interferón α que ofrecen algunos genotipos (ej: genotipos 1 y 4 son más resistentes que el 2 y 3 a la terapia combinada de ribavirina e interferón- α pegilado) (Hnatyszyn 2005).

El diagnóstico serológico de la infección por VHC se realiza mediante la detección de los anticuerpos específicos por EIA, preferentemente de tercera generación, que permite identificar además los fenotipos conocidos.

La detección del ácido nucleico del VHC por NAT no sólo permite el diagnóstico de la infección aguda previo a la seroconversión sino también el diagnóstico en pacientes seronegativos con inmunodeficiencias, contribuyendo de esa forma a la investigación en infección congénita (Clancy, Crowley et al. 2008). Así mismo, las técnicas serológicas son incapaces de distinguir entre una infección crónica y una infección resuelta, mientras que la detección del ARN viral permite dicha distinción (Krajden 2000; Erensoy 2001). Además, mediante la determinación de la carga viral por RT-PCR es posible confirmar resultados indeterminados por serología así como también evaluar la respuesta a la terapia antiviral en pacientes con infección por VHC, ya que la presencia del ARN viral demuestra infección activa (Busch and Dodd 2000; Erensoy 2001; Germer and Zein 2001; Coste, Reesink et al. 2005; Scott and Gretch 2007). Esto es de fundamental importancia para la calidad de vida del paciente y para el impacto económico en el sistema de salud. Debido a que las técnicas serológicas poseen menor capacidad de detección e identificación de los genotipos (fenotipos) y subtipos que aquellas basadas en biología molecular, para algunos autores la RT-PCR es considerada la técnica de elección para la detección del ARN/VHC en suero o plasma (Weiner, Truett et al. 1990; Farci, Alter et al. 1991; Clancy, Crowley et al. 2008).

La mayoría de los ensayos comerciales disponibles para la detección del ARN/VHC se basan en RT-PCR. Los métodos cuantitativos permiten determinar la carga viral y son de gran importancia en la evaluación de la respuesta a la terapia antiviral durante todo el tratamiento, mientras que los métodos cualitativos poseen en

general un mejor límite de detección, muchas veces menor al de las técnicas cuantitativas, por lo que son muy útiles para confirmar la ausencia total del virus al final de un tratamiento. Dado que en las dos semanas posteriores a la infección por el VHC se generan altas concentraciones de partículas virales, tanto las técnicas de detección cualitativas como cuantitativas son muy útiles (Fig. 1).

A pesar de que se han desarrollado nuevos métodos para genotipificación molecular con relativa practicidad de aplicación y satisfactorios para la discriminación de la mayoría de los genotipos, la diferenciación entre los subtipos sigue siendo un desafío (Germer and Zein 2001).

IIB- Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)

El virus de la Inmunodeficiencia Humana 1 y 2 (VIH-1 y VIH-2) es el agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), estado de infección persistente en humanos que conduce a un deterioro crónico del sistema inmunológico. El VIH es un retrovirus perteneciente a la familia de los lentivirus de aproximadamente 100-150 nm y su genoma consiste de una simple hebra de ARN de polaridad positiva de aproximadamente 9.200 nucleótidos. Entre los genes estructurales, *gag* codifica para proteínas del núcleo viral, *pol* codifica para varias enzimas como la transcriptasa reversa y *env* que codifica para glicoproteínas de la envoltura viral. Es un virus con envoltura y posee en su interior una transcriptasa reversa, enzima que convierte el ARN en ADN doble cadena. La misma es muy susceptible a error de replicación, lo que permitiría explicar la rápida variación genética *in-vivo*. En base a estudios de filogenética molecular, en relación a *gag* y *env*, se han logrado identificar tres genotipos principales del VIH-1: M, N y O y algunas formas recombinantes. El mayor grupo es el M, el cual contiene subtipos nombrados de A-K, así como también formas recombinantes como AB, AE, AG, AGI, AA-GH. El subtipo B es más predominante en Europa y América del Norte, los subtipos A, C y E predominan en África, el D en Tailandia y finalmente el subtipo F es muy prevalente en Brasil y Argentina, así como también el subtipo B en Argentina.

El análisis diagnóstico en adultos y niños mayores de 18 años se realiza por la detección de anticuerpos específicos por EIA como método de *screening* de alta sensibilidad diagnóstica. Si el resultado es reactivo se debe confirmar mediante la técnica de *Western Blot*, altamente específica. Los métodos de detección del antígeno p24 tienen en general una baja sensibilidad diagnóstica. La detección directa del virus se puede realizar mediante la determinación del ARN viral en plasma por RT-PCR o bien del ADN pro-viral por PCR. La detección del ARN viral no es empleado como método diagnóstico, solo puede ser usado como técnica complementaria en casos de resultados indeterminados obtenidos por las técnicas serológicas descritas.

III- TÉCNICAS BASADAS EN LA AMPLIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

IIIa- Generalidades

Las técnicas basadas en la amplificación de ácidos nucleicos (NAT) se fundamentan en la capacidad de detección directa del genoma de cualquier organismo, especialmente virus, sean estos ARN o ADN. NAT combina la alta especificidad de detección de un agente infeccioso con una sensibilidad analítica superior a la de los métodos de detección serológicos y antigénicos o de cultivo celular, en varios órdenes de magnitud.

Varios métodos de amplificación específica de secuencia de ácidos nucleicos virales han sido desarrollados. Los disponibles comercialmente se pueden resumir en (Candotti, Richetin et al. 2003):

- RT-PCR
- PCR
- Reacción en cadena de la ligasa
- Amplificación isotérmica de ácidos (NASBA)
- Amplificación mediada por transcripción (TMA).

La técnica de PCR permite la amplificación específica *in vitro* de segmentos de ADN o ADNc (en caso de organismos con ARN) y posee como característica más sobresaliente un bajo límite de detección, que hace factible la detección de hasta una molécula de ácido nucleico presente en una muestra. Además, la versatilidad de la técnica permite adecuar protocolos para lograr una óptima especificidad mediante el diseño de oligonucleótidos iniciadores que permitan identificar especies virales y aún más, discriminarlas en relación a sus variantes genotípicas. El método analítico consta de tres partes básicas: aislamiento del ácido nucleico, amplificación de la secuencia blanco y detección/caracterización y/o cuantificación del producto de amplificación. En el caso de virus ARN el paso previo a la amplificación es la transcripción reversa que permite generar un ADNc.

IIIb- Validación de NAT para la detección del ARN del VHC en mezclas de plasma humano.

Con el propósito de efectivizar la aplicación de NAT para la detección del ARN/VHC en pools de plasma, desde el año 1999 se exige en Europa la validación de la misma, acorde a regulaciones internacionales (ICH 1994; CPMP 1997; EDQM 2012). Según estas guías, para garantizar la confiabilidad de la técnica se deben evaluar los siguientes parámetros analíticos: límite de detección, especificidad y robustez.

i- Límite de detección: El punto positivo de *cut-off* está definido, según la FE cap. 2.6.21, (EDQM 2012) como el número mínimo de secuencias del templado por volumen de muestra que puede ser detectado en el 95% de los ensayos realizados. En técnicas cualitativas o semicuantitativas este valor puede considerarse como una expresión del límite de detección de la técnica. El mismo está influenciado por la distribución de los genomas virales en las muestras individuales a analizar y por factores intrínsecos como la eficiencia de la enzima polimerasa. En relación a regulaciones internacionales europeas la técnica desarrollada debe ser capaz de detectar un control positivo de ARN/ VHC de 100 UI/ml.

ii- Especificidad: La técnica debe ser específica y ésta depende tanto del diseño de los primers como sondas y astringencia en las condiciones de reacción (condiciones de amplificación y detección). El diseño de los primers debe ser adecuado para evitar hibridaciones inespecíficas con secuencias no relacionadas a la secuencia blanco (VHC) y permitir la detección de los diferentes genotipos correspondientes. El producto de amplificación debe ser inequívocamente identificado por el uso de distintos métodos como amplificación con primers nested, análisis de enzimas de restricción, secuenciamiento o hibridación con sondas específicas.

iii- Robustez: la técnica debe tener la capacidad de no alterar sus parámetros analíticos de manera significativa en respuesta a mínimas desviaciones en las condiciones experimentales.

Según EDQM, un procedimiento analítico completo basado en NAT comprende todas las etapas involucradas, no sólo con la técnica sino también con las etapas pre y pos-analíticas, que pueden resumirse de la siguiente manera:

1. Acondicionamiento de muestras y controles
2. Extracción del ácido nucleico viral.
3. Retrotranscripción (obtención del ADNc) en caso de virus ARN.
4. Amplificación del ADN por PCR.
5. Detección del producto de amplificación.
6. Registro e interpretación de los resultados
7. Análisis estadístico
8. Aseguramiento de la Calidad

1- Acondicionamiento de muestras y controles

La reacción de PCR se caracteriza por contar con una notable sensibilidad y límite de detección por lo que es común que se generen resultados **falsos positivos** por contaminación cruzada. Además, la enzima ADN polimerasa es muy susceptible a inhibidores que alteran la eficiencia de la reacción. La inhibición de la enzima, así como también la degradación del ácido nucleico por contaminantes, pueden conducir

a resultados **falsos negativos**. Por todo ello, se deben tener especiales cuidados en la preparación y manejo de reactivos, muestras y elementos involucrados en la técnica. Es aconsejable contar con una apropiada infraestructura de laboratorio que incluya áreas segregadas y flujo de trabajo: un área de preparación de reactivos, un área de procesamiento de muestras y finalmente un área destinada a la amplificación (Kwok and Higuchi 1989). En este sentido, se debe evitar el traspaso de elementos (reactivos, tubos, papeles, guantes, equipos, etc.) desde las áreas de amplificación hacia las de preparación de reactivos o muestras. Debe existir personal especialmente calificado que opere con idoneidad y pericia. La incorporación de ciertos controles de calidad durante la ejecución del método permite una mejor interpretación de los resultados, a saber:

a- Controles externos

Con el propósito de minimizar el riesgo de contaminación y monitorear el límite de detección, los siguientes **controles externos** deben ser incluidos en cada ensayo de PCR:

i- Control positivo: corresponde a una dilución de un estándar primario internacional o de un estándar secundario de referencia, y su valor debe corresponder a un múltiplo del punto positivo (*cut off*) obtenido de la técnica validada (ej: 3X).

ii- Control negativo: corresponde a una muestra con la misma matriz que las muestras a analizar pero libre de la secuencia blanco. Durante la ejecución de la técnica es recomendable posicionar el control negativo de manera tal que las muestras a analizar queden separadas de los controles positivos por medio del mismo. Esta metodología permite detectar la presencia de contaminación cruzada.

iii- Control de reactivo: está conformado por agua estéril cbm o agua libre de nucleasas en reemplazo del volumen que ocupa el ADN o ADNc en la mezcla de reacción. Su uso es opcional y permite detectar la contaminación de reactivos.

b- Control interno (CI)

Constituye una secuencia de ácido nucleico cuya naturaleza está relacionada con el ácido nucleico a detectar, identificar y/o cuantificar, pero con alguna

modificación en su estructura que permita la diferenciación entre los mismos. Debe añadirse a la muestra al inicio del proceso para que actúe monitoreando toda la marcha analítica incluyendo los procedimientos de extracción, transcripción reversa, amplificación y detección/identificación/cuantificación del ácido nucleico. Debe ser amplificado con eficacia y los amplicones deben ser claramente discernibles (Rogan 1991; Rosenstraus, Wang et al. 1998; Aberham, Pendl et al. 2001). De esta manera, el CI permite detectar resultados falsos negativos.

2- Extracción del ácido nucleico

Es necesario realizar una eficiente y reproducible purificación del ácido nucleico del material biológico a analizar de tal forma que la amplificación sea posible bajo condiciones óptimas de reacción. La extracción permite no solo concentrar el material genético sino también liberarlo de los contaminantes e inhibidores que puedan afectar la reacción de amplificación. Un gran número de técnicas fueron desarrolladas, muchas de ellas basadas en el uso de solventes orgánicos como fenol-cloroformo/tiocianato de guanidinio, a pH ácido (virus ARN) o pH alcalino (virus ADN), combinadas con tratamiento alcohólico en diferente graduación para precipitar el ácido nucleico. El tratamiento con proteasas previo a la extracción permite liberar el ácido nucleico de las estructuras celulares, mientras que el uso de tiocianato de guanidinio se introdujo como agente caotrópico para desnaturalizar las proteínas presentes en la matriz. Existen métodos más modernos para purificar ácidos nucleicos, algunos emplean columnas de sílica que permiten la adsorción de los ácidos nucleicos bajo la acción de soluciones caotrópicas y otros emplean partículas magnéticas que aprovechan las propiedades físicas de los mismos.

3- Retrotranscripción (obtención del ADNc)

Consiste en sintetizar ADNc a partir de ARN mediante el uso de transcriptasas reversas y primers oligodesoxinucleótidos como ser oligonucleótidos específicos, hexanucleótidos random u oligo-desoxitimidina trifosfato, según el propósito de la técnica.

4- Amplificación del ADN

Se fundamenta en una reacción enzimática que, en su transcurso, va generando un producto de reacción específico en cantidad suficiente para ser detectado ó cuantificado. La cinética de la reacción es de tipo exponencial y se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$Q_n = Q_0 \cdot E^n$$

Donde:

Q = cantidad de ADN,

n = número de ciclos,

0 = ciclo de partida,

E = Eficiencia de la reacción.

En base a esta ecuación, el producto (Q) incrementa exponencialmente a medida que aumenta el número de ciclos (n), dependiendo de la cantidad inicial de moléculas de ADN.

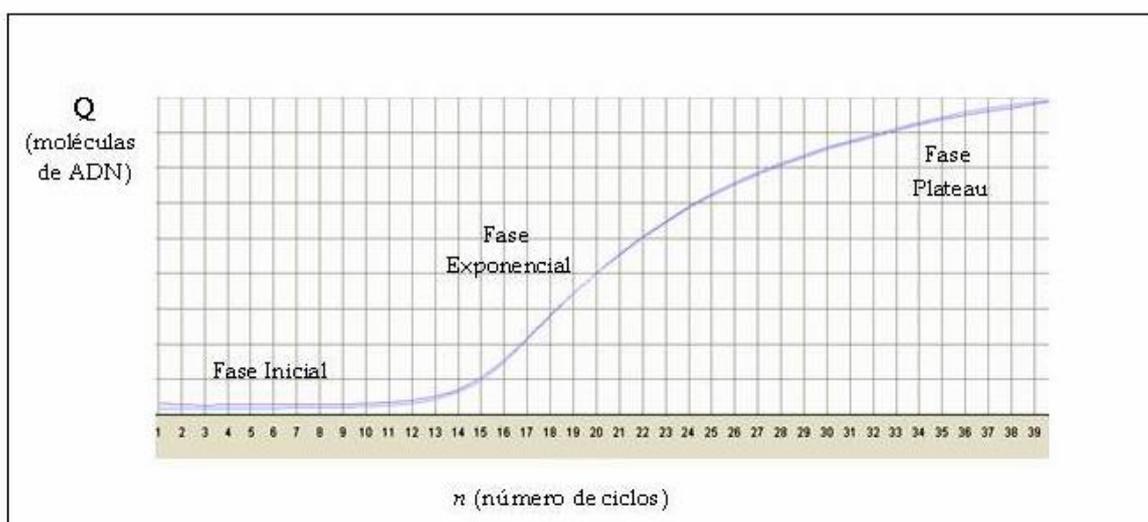


Figura 5. Cinética de la PCR. Cantidad de producto de amplificación en función del número de ciclos.

La cantidad de producto de amplificación de la reacción de PCR en función del número de ciclos (Fig. 5) muestra tres fases bien definidas:

- i. Fase inicial, sin pendiente, donde aún no se evidencia incremento de producto.
- ii. Fase exponencial, es la fase de mayor pendiente, en donde la cantidad de producto de amplificación aumenta en función al número de ciclos realizados.

- iii. Fase de *plateau*, etapa final de la reacción en la cual ya no hay incremento de producto debido al consumo de reactivos.

Los componentes básicos de la reacción son: ADN molde, agua libre de nucleasas, desoxinucleótidos (dNTP's), Taq Polimerasa, cloruro de magnesio (co-factor de la enzima), oligonucleótidos iniciadores específicos (primers), solución amortiguadora y sales. La eficiencia de la reacción está influenciada principalmente por la cantidad de oligonucleótidos iniciadores y por la actividad de la ADN polimerasa. En la práctica, la eficiencia de amplificación oscila entre 80 y 90%, que junto a la concentración de reactivos son determinantes para establecer el punto final de la reacción.

La PCR se conforma de tres pasos secuenciales que se repiten en un número de ciclos predeterminados (n), bajo condiciones estrictas de temperatura:

1°- desnaturalización del ácido nucleico de la secuencia blanco en dos cadenas simples (en caso de ácido nucleico de doble cadena). Normalmente ocurre entre 90 y 95°C.

2°- hibridación específica de los oligonucleótidos complementarios en ambas cadenas de ADN, normalmente entre 50 y 65 °C (la temperatura seleccionada depende de la naturaleza de la secuencia de los oligonucleótidos), y

3°- polimerización del ADN por una enzima (ADN polimerasa) que completa la síntesis del ADN sintético, normalmente entre 60 y 72 °C (la temperatura seleccionada depende de la naturaleza de la ADN polimerasa).

Repetidos ciclos de desnaturalización/ hibridación de los oligonucleótidos/ polimerización del ADN resultan finalmente en una amplificación exponencial de segmentos delimitados por los oligonucleótidos específicos. En algunos casos se realiza una segunda amplificación (Nested-PCR o PCR anidada) empleando como molde una alícuota del producto de la primera reacción de PCR más el agregado de primers que hibriden en una zona interna de la secuencia blanco. Esto permite mejorar el límite de detección y la especificidad de la técnica, por lo que es muy útil cuando se aplica a la detección de ácidos nucleicos virales presentes en grandes mezclas de plasma. La PCR múltiple o *múltiplex*-PCR es una reacción que permite la amplificación simultánea de

diferentes secuencias de ADN en una misma reacción, utilizando más de un par de oligonucleótidos complementarios diseñados para cada una.

5- Detección-caracterización y/o cuantificación del producto de amplificación

Los amplicones generados (productos de PCR) pueden ser identificados por tamaño, secuencia, modificación química o alguna combinación de algunos de estos parámetros. En técnicas cualitativas, llamadas de punto final, el producto de amplificación puede ser detectado y caracterizado en la fase final (*plateau*) de la cinética de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio, en presencia de un marcador de tamaño molecular o bien mediante electroforesis capilar. Existe una tecnología más moderna que permite la cuantificación relativa o absoluta del ADN denominada PCR a Tiempo Real (qPCR), mediante la cual es posible automatizar la identificación de los productos de amplificación. Estos pueden ser detectados y cuantificados en la fase exponencial de la reacción con el empleo de intercalantes inespecíficos (SYBR, etc.) que se unen al ADN doble cadena o sondas fluorescentes específicas de secuencias.

6- Interpretación y registro de los resultados

Es necesario establecer una correcta interpretación de los resultados obtenidos por PCR. Esto es posible gracias a la inclusión de los controles previamente descritos. Además, el registro de los resultados permite acceder a una adecuada trazabilidad, necesaria para controlar las condiciones experimentales del ensayo diario y de esta manera detectar las principales causas de error.

Según criterios asignados para la interpretación de un resultado, un **ensayo es válido** sólo si el **control positivo externo** es indudablemente positivo y el **control negativo externo** es indudablemente negativo. Si esto no sucede, se invalidan los resultados de las muestras individuales.

- i- **Resultado positivo de una muestra:** se obtiene cuando el **ensayo es válido** y además se evidencia la presencia del producto de amplificación correspondiente a la secuencia blanco, **con** o **sin** la presencia del producto de amplificación correspondiente al CI.

- ii- Resultado negativo de una muestra:** se obtiene cuando **el ensayo es válido** y además **no** se evidencia la presencia del producto de amplificación correspondiente a la secuencia blanco pero **se evidencia siempre** la presencia (esto es excluyente) del producto de amplificación correspondiente al CI.
- iii- Resultado inválido de una muestra:** se obtiene cuando el ensayo no es considerado válido o cuando no se evidencia la presencia del producto de amplificación del CI, ni el de la secuencia de interés, en la misma muestra.

7- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realiza para obtener el valor del límite de detección. En el caso de técnicas cualitativas se puede realizar con programas de bioestadística que emplean el método Probit descrito en FE (cap. 5.3, <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>).

8- Aseguramiento de la Calidad

Finalmente, se deben tener consideraciones especiales para asegurar la calidad analítica de la técnica de PCR como ser la existencia de un programa de calificación técnica de los equipos críticos de trabajo (ej: termocicladores) así como un programa de capacitación técnica para calificar analistas. Además, es imprescindible la participación en estudios internacionales de control de calidad interlaboratorio que permita la evaluación de la técnica de manera permanente.

IIIc- Detección del ARN/VHC y ARN/VIH-1 por NAT: técnicas disponibles

Durante la última década la aplicación de técnicas de detección de ácidos nucleicos, tanto cualitativas como cuantitativas, ha tenido su mayor impacto en la virología clínica. Los métodos basados en amplificación de secuencia y amplificación de señal ya son empleados en la rutina de muchos laboratorios de virología clínica. Existen métodos comerciales disponibles para determinados virus pero el espectro de

aplicación es más bien reducido y sólo están disponibles para virus de gran interés comercial (Tabla 4).

Tabla 4. Ensayos NAT comerciales y no comerciales disponibles para virología clínica hasta 2004: blancos de interés, adaptada (Niesters 2004).

Ensayos comerciales disponibles	Ensayos no comerciales disponibles
Virus de la Inmunodeficiencia Humana-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana-2
Virus de la Hepatitis B	Virus Epstein-Barr
Virus de la Hepatitis C	Virus del Herpes Simple 1 y 2
Citomegalovirus	Citomegalovirus
Virus del Papiloma Humano	Virus del Herpes tipo 6
Parvovirus B19 (pos 2004)	Virus de la Varicela Zoster
	Enterovirus
	Rinovirus
	Virus influenza
	Coronavirus
	Virus Respiratorio sincicial
	Metaneumovirus humano
	Adenovirus
	Astrovirus
	Calicivirus

Debido al costo relacionado con la implementación de métodos comerciales, el desarrollo de técnicas de tipo caseras ("*in-house*") ha cobrado cierto auge, permitiendo generar ensayos para una amplia diversidad de virus.

Particularmente para ARN/VHC y ARN/VIH, existen diversos métodos de detección cualitativa y cuantitativa, tanto comerciales como *in-house*. Los cualitativos poseen en general mejor límite de detección (especialmente Nested-PCR) y son altamente específicos. Ejemplo de ellos son los que incluyen amplificación de secuencia como RT-PCR, RT-Nested/PCR y amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (NASBA). Mediante los mismos es posible detectar niveles de ARN/VHC hasta 5-10 UI/ml (Domiasi-Saad and Scheuermann 2006) con una especificidad diagnóstica cercana al 99%. AMPLICOR HCV Test (no automatizado) y COBAS® AMPLICOR HCV Test v2.0 (automatizado) son métodos de RT-PCR cualitativos

comerciales que permiten detectar en plasma y suero hasta 50-60 UI/ml de ARN/VHC.

En cuanto a los ensayos cuantitativos, distintas plataformas están disponibles para el ARN/VHC, algunos basados en técnicas de amplificación de señal con tecnología *branched DNA* (bDNA: Versant HCV RNA 3.0 assay, Bayer Diagnostics, Cergy Pontoise, France) o en amplificación específica de secuencia como NASBA ó qPCR (Castelain, Descamps et al. 2004). El límite de detección de los métodos cuantitativos oscila entre 25 UI/ml y 1.000 UI/ml y el rango dinámico de cuantificación varía mucho acorde a la plataforma (Tabla 5).

La cuantificación absoluta de la carga viral mediante qPCR es una de las estrategias más prometedoras en el área de la virología en relación al VHC (Le Guillou-Guillemette and Lunel-Fabiani 2009), ofreciendo un óptimo límite de detección con los consecuentes beneficios, especialmente aquellos relacionados con la respuesta y monitoreo del tratamiento antiviral.

Tabla 5. Rangos dinámicos de ensayos cuantitativos comerciales para ARN/VHC, adaptada (Domiat-Saad and Scheuermann 2006).

Ensayo	Rango Dinámico
Versant ARN HCV 3.0	615 a 7.700.000 UI/ml
COBAS Amplicor HCV monitor v2.0	600 a 500.000 UI/ml
SuperQuant	30 a 1.470.000 UI/ml
LCx ARN HCV	25 a 2.630.000 UI/ml
HCV COBAS TaqMan 48 ASR (real time)	25 - 50 a 10.000.000 UI/ml
HCV Quantitation ASR (Abbott) (real time)	25 a 5.000.000 UI/ml

En relación a los métodos para evaluar ARN/VIH-1, existen tres reactivos validados a nivel internacional para la determinación de la carga viral (Murphy, Cote et al. 2000; Shepard, Schock et al. 2000; Won, Park et al. 2001; MSP 2006): RT-PCR Amplicor HIV-1 Monitor Roche (*test* estándar y ultrasensitivo), NASBA Nuclisens Biomerieux y Branched DNA Quantiplex Bayer. En general el límite de detección estándar de las técnicas disponibles se encuentra alrededor de 400 copias/ml (1 copia de ARN/VIH-1 ~1,7 UI) mientras que en los métodos comerciales citados oscila entre

40 y 50 copias/ml. Respecto de estas técnicas, es distinta la capacidad para cuantificar los diferentes subtipos del grupo M del VIH-1; el método Branched DNA Quantiplex Bayer tiene mejor capacidad de detección y cuantificación de los subtipos del grupo M ya que emplea como blanco el gen *pol*, que posee regiones relativamente conservadas dentro de los retrovirus. No obstante, ninguno de los tres métodos disponibles es capaz de cuantificar ni detectar el genotipo O del VIH-1 y el VIH-2.

En últimos estudios internacionales de control de calidad interlaboratorio (Holmes, Davis et al. 2008) se evidenciaron claras limitaciones en algunos métodos moleculares, tanto comerciales como *in-house*, para detectar y cuantificar algunos genotipos y subtipos. Los grupo N y O son los principalmente afectados en este sentido aunque algunos métodos han demostrado tener dificultad para detectar genotipos no-B, especialmente los subtipos F y G y la variante recombinante AA-GH, la mayoría de ellos de real implicancia en la pandemia global del SIDA. Con el aporte de novedosos sistemas informáticos que permiten diseñar cuidadosamente oligonucleótidos de óptima especificidad ha sido posible mejorar la especificidad para una variedad más amplia de genotipos y subtipos, así como también de aislados y cuasiespecies virales, con adecuada sensibilidad diagnóstica. Este hecho es de gran relevancia para virus que, por su alta probabilidad de generar variabilidad genómica *in vivo* como en el caso del VIH, tienen la capacidad de formar nuevas especies recombinantes.

La cuantificación del ARN/VIH-1 por qPCR (Palmer, Wiegand et al. 2003; Gibellini, Vitone et al. 2004) posee, en relación a las tradicionales técnicas de PCR, una mayor reproducibilidad, rapidez y menor límite detección (<50 copias/ml, inclusive en algunas técnicas es posible detectar 1 copia/ml) así como también una mayor especificidad y capacidad de detectar y cuantificar los genotipos y subtipos. Además, el límite superior de cuantificación es mayor, lo que permite omitir la dilución de muestras con alta carga viral. En la actualidad, existe una nueva generación de ensayos aprobados por ANMAT de qPCR: COBAS TaqMan HIV-1 Test (Roche), Nuclisense EASY Q HIV-1 (NASBA Biomerieux).

En la tabla 6 y tabla 7 se mencionan las técnicas usadas por bancos de sangre de algunos países, con sus características más sobresalientes. La elección de la

tecnología a aplicar en cada laboratorio depende de las necesidades, así como de la evaluación de costo/beneficio.

Tabla 6. Características de los métodos basados en NAT empleados para el tamizaje en distintos países hasta 2005, adaptada (Coste, Reesink et al. 2005).

País	Metodología			Tamaño del pool			Automatización
	Chiron (1)	Roche (2)	In-house	Chiron (1)	Roche (2)	In-house	
Austria	-	20%	80%	-	-	≤ 96	Parcial
Bélgica	100%	-	-	8	-	-	Parcial
Inglaterra	33%	66%	-	48	48	-	Parcial
Finlandia	-	100%	-	-	96	-	Parcial
Francia	30%	70%	-	8	24	-	Parcial
Alemania	< 10%	10%	80%	< 24	< 48	48-96	Parcial
Italia	46%	54%	-	1-8	10-24	-	Parcial
Holanda	-	100%	-	-	48	-	Parcial
Suiza	-	100%	-	-	48(RBC) 16(PTL)	-	Parcial
Eslovenia	-	100%	-	-	24	-	Parcial
Australia	100%	-	-	24 (80%) DI (20%)	-	-	Parcial
Canadá	-	100%	-	-	24	-	Parcial
Hong Kong	100%	-	-	24	-	-	Parcial
Estados Unidos	70%	30%	-	16 (<3% DI)	24	-	Parcial

1- Procleix HIV-1/HCV TMA (Chiron Blood testing)

2- Ampliscreen HIV-1, Ampliscreen HCV (Roche Molecular Diagnostic).

DI, donación individual

PLT, plaquetas de aféresis

RBC, glóbulos rojos

Tabla 7. Performance analítica de las técnicas NAT aplicadas en distintos países, adaptada (Coste, Reesink et al. 2005)

PAÍS	Sensibilidad (95% Límite de Detección) en donación individual		Especificidad	
	VHC (UI/ml)	VIH-1 (UI/ml)	VHC (%)	VIH-1 (%)
Austria (R/IH)	desconocido	desconocido	desconocido	desconocido
Bélgica (C)	100 copias/ml	100 copias/ml	99-97	99-97
Inglaterra (C/R)	10/26	24/ND	100	100
Finlandia (R)	18	no desarrollado	100	no desarrollado
Francia (C/R)	15/13	23/28	99,9	99,9
Alemania (C/R/IH)	<1000	<1000	100	100
Italia (C/R)	100 (requerimiento)	desconocido	desconocido	desconocido
Holanda (R)	4	32 (16-76)	99,95	99,84
Suiza (R)	8	85	99,70	99,64
Eslovenia (R)	4	no desarrollado	100	no desarrollado
Australia (C)	10 (gen1) 21 (gen3)	28 (General E/B)	>99,9	>99,9
Canadá (R)	29 (WHO)	78 (WHO)	100	100
Hong Kong (C)	10 (gen1) 21 (gen3)	28 (General E/B)	>99,9	>99,9
Estados Unidos (C/R)	12 geq/ml / 11 geq/ml	5 geq/ml / 14 geq/ml	>99,9	>99,9

La Sensibilidad es expresada en base a los resultados obtenidos del análisis por probit

La Especificidad es basada en la tasa de resultados falsos positivos obtenidos de grandes tamizajes en bancos de sangre

C: Chiron; General E/B: genotipos E y B del VIH-1; geq: genomas equivalentes; IH: in-house; ND: no determinado; R: Roche; WHO: World Health Organization

IIIId- Uso del Control Interno en PCR para la detección de ARN/VHC y ARN/VIH-1

Entre las mayores dificultades que normalmente se encuentran asociadas a PCR pueden ser citadas, tanto la presencia de **falsos positivos** por contaminación cruzada, como **falsos negativos** a consecuencia de errores de proceso, presencia de inhibidores de reactivos, contaminantes o sustancias desnaturizantes del ácido nucleico purificado. Existen inhibidores de la reacción que se co-purifican con el ADN y alteran la actividad de la ADN polimerasa (Paabo and Wilson 1988; Hagelberg, Sykes et al. 1989; Hagelberg and Clegg 1991; Hochmeister, Budowle et al. 1991; Rossen, Norskov et al. 1992), microorganismos o células (inclusive humanas) que son fuentes de ARNasas o contaminantes que alteran la reacción de PCR o consumen algún reactivo. Se ha demostrado que la hidrólisis del ARN puede ser promovida por un pH alto, temperaturas elevadas y por presencia de cationes divalentes como

magnesio y manganeso (Pasloske, Walkerpeach et al. 1998). Detergentes, lisozima, NaOH, alcoholes, EDTA, EGTA, usados en procesos de extracción, pueden tener un efecto inhibitorio en la PCR (Rossen, Norskov et al. 1992). La heparina es un anticoagulante que inhibe a la polimerasa, por lo que no debe ser empleada en los métodos de extracción y conservación de sangre para estudios de biología molecular. Adicionalmente, cuestiones técnicas como ser mal funcionamiento del termociclador, ineficiente purificación del ácido nucleico, errores de operador en el muestreo, defectos físicos de los tubos de plástico o bien fallas en la transcripción reversa, pueden conducir a resultados falsos negativos.

Una de las formas que permite detectar resultados falsos negativos es la incorporación de un CI. Mediante la presencia del mismo en una muestra no reactiva, es posible confirmar la existencia de un resultado verdaderamente negativo. El CI es muy útil para detectar tanto errores sistemáticos como errores de precisión, otorgando calidad en la interpretación de un resultado. La inclusión del CI no sólo brinda un diagnóstico de las fuentes de error en los pasos críticos de la técnica sino que también permite tomar directivas para eliminar estas fuentes de error.

Una de las mayores falencias, muchas veces subestimada en técnicas *in-house*, es la ausencia de un CI (Pasloske, Walkerpeach et al. 1998; Niesters 2001). Desafortunadamente, muchas de las técnicas disponibles no cuentan con este reactivo, por lo que es imperativo incorporarlo al análisis rutinario de cada laboratorio de biología molecular.

FE ha establecido que para garantizar el Aseguramiento de la Calidad en los protocolos de validación de NAT, es necesario incluir como requisito esencial un CI (EDQM 2012).

En su diseño, un adecuado CI debe estar libre de los especímenes a testear, ser capaz de distribuirse de manera homogénea en las muestras, ser estable, y debe tener la capacidad de verificar la eficiencia del procedimiento en todas sus etapas (Pasloske, Walkerpeach et al. 1998; Niesters 2004). Además, debe mimetizar de la mejor manera posible la naturaleza del ácido nucleico de la especie a detectar e identificar, debe co-purificarse y co-amplificarse de manera reproducible con el

mismo y los productos de amplificación deben ser claramente discernibles (Rogan 1991; Rosenstraus, Wang et al. 1998; Aberham, Pendl et al. 2001).

La estrategia más importante para la incorporación de un CI ha sido la adición de un CI exógeno a cada muestra en la etapa de purificación del ácido nucleico. En relación a ello se han descrito numerosos Controles Internos (CIs) competitivos y no competitivos (Pasloske, Walkerpeach et al. 1998; Cleland, Nettleton et al. 1999; WalkerPeach, Winkler et al. 1999; Drosten, Seifried et al. 2001; Beld, Minnaar et al. 2004; Dingle, Crook et al. 2004; Eisler, McNabb et al. 2004; Hoorfar, Malorny et al. 2004; Dreier, Stormer et al. 2005; Hietala and Crossley 2006). El CI no competitivo está diseñado de tal manera que no compite con la secuencia diana por los oligonucleótidos iniciadores de la PCR (o RT-PCR) mientras que el competitivo sí lo hace. Esta última situación constituye la condición más fiel desde el punto de vista analítico ya que permite detectar fuentes de error originadas en las soluciones de los oligonucleótidos iniciadores de la PCR así como también en las temperaturas de hibridación.

Debido al gran número de resultados falsos negativos y a la escasez de estudios realizados para detectar posibles inhibidores, se ha intentado estandarizar a nivel internacional CIs patrones en el campo de la microbiología y el diagnóstico clínico (Hoorfar and Cook 2003; Hoorfar, Cook et al. 2003). Algunos desarrollados comercialmente están contenidos dentro de los equipos de reacción y se conoce poco o nada acerca de la naturaleza y características de los mismos. Algunos de ellos son CIs que no cumplen con las características generales que deben tener, como ser CIs cuya naturaleza química se basa en ADN y son empleados en técnicas para detectar un virus tipo ARN. En este sentido, el CI/ADN no experimentará las mismas condiciones que una molécula de ARN. Actualmente, existe una gran dificultad para adquirir un reactivo que cumpla las funciones de ser un CI para el análisis por PCR de muestras biológicas como plasma, suero y productos hemoderivados, en el testeo de ácidos ribonucleicos como el VHC y el VIH-1. Si bien existen técnicas comerciales diseñadas para la detección y cuantificación de estos virus, los CIs que poseen son parte exclusiva de un sistema integrado y cerrado de reacción, por lo que no es posible la adquisición de los mismos de manera separada.

La falta de CIs que constituyan un reactivo o un set de reactivos por sí mismos y que además, sean de fácil inclusión, adaptación y aplicación a técnicas de PCR *in-house* para los fines mencionados, generó la necesidad de plantear el desarrollo y síntesis de un CI para responder a las demandas de calidad.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es desarrollar un CI que permita responder a las exigencias nacionales e internacionales de calidad necesarias para la implementación de técnicas basadas en RT-PCR, para la detección del ARN/VHC y ARN/VIH-1.

Los objetivos específicos son el diseño y síntesis del CI, la optimización de su incorporación a las técnicas de análisis, la validación de las mismas y la implementación en análisis rutinario del plasma y HD.

Se prevé que los resultados a obtener se consoliden en el desarrollo de un CI que permita el control completo de la técnica de RT-Nested-PCR para el monitoreo de los resultados falsos negativos en la detección del ARN/VHC y ARN/VIH-1, mediante un proceso reproducible y económico. Además, que tanto el CI como los procedimientos relacionados con su aplicación, puedan ser transferidos a otros laboratorios en los cuales se justifique su aplicación.

MATERIAL Y MÉTODOS

I- CONSTRUCCIÓN DEL CONTROL INTERNO

Ia) Obtención del ADNc molde de 258pb (ADN-258) de una secuencia ubicada en la región 5' no codificante del ARN del VHC.

Se preparó una muestra de 10.000 UI/ml ARN/VHC diluyendo un estándar internacional (SI) de ARN/VHC (2nd International Standard Hepatitis C Virus RNA, code 96/798, WHO/NIBSC, UK, 50.000 UI/vial) en plasma negativo para ARN/VHC, ARN/VIH, AgsVHB, Anti-VIH y anti-VHC. Se purificó una alícuota de 200 µl de la muestra, empleando un kit comercial de extracción de ácidos nucleicos virales (QIAmp® Mini Elute® Virus Spin Kit, QIAGEN), de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente, empleando como molde 10 µl del ARN extraído, se sintetizó el ADNc mediante transcripción reversa (RT) según protocolo de reacción **RT #1** (Anexo).

Una alícuota de 5 µl del ADNc sintetizado fue sometida a una reacción de PCR según protocolo de reacción **PCR #1** (Anexo). La secuencia amplificada flanqueada por los oligonucleótidos p1 y p2, corresponde a un fragmento de **258 pb** de la región 5' no codificante del genoma del ARN/VHC (núm. acceso: AF009606), que contiene un sitio de restricción reconocido por la enzima *NheI*, el cual fue utilizado para insertar una secuencia de 52 pb de diseño único.

Con el propósito de aumentar la cantidad de producto de amplificación correspondiente a 258 pb y poder visualizarlo en gel de agarosa, se realizó una segunda PCR según protocolo de reacción **PCR #2** (Anexo), utilizando como molde una alícuota de 5 µl del producto obtenido en la reacción anterior. La detección del producto de amplificación de 258 pb se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular.

Para corroborar la especificidad del producto de amplificación, una alícuota de 5 µl del producto de amplificación obtenido de **PCR #2** fue sometida a una reacción de PCR con primers internos según protocolo de reacción **PCR #3** (Nested-PCR) (Anexo). La detección del producto de amplificación de **212 pb** fue realizada

mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular.

Ib- Clonación del fragmento amplificado correspondiente al ADN-258 (TOPO-258)

El producto de amplificación de **258 pb** fue ligado al vector de clonado TOPO TA Cloning®, pCR® 2.1-TOPO®, (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El producto de la ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5α de acuerdo al protocolo descrito en Anexo. Se sembraron 100 μl de la suspensión de bacterias transformadas en una placa con LB- agar con ampicilina (50 mg/ml) y se incubó la placa a 37 °C por 24 h.

Para verificar la presencia del inserto en las colonias Amp^r (bacterias que incorporaron el plásmido) se procedió de la siguiente manera: muestras de las colonias crecidas se incubaron a 97 °C por 5 minutos en 50 μl de agua c.b.m. Una alícuota de 1 μl del sobrenadante obtenido por centrifugación (plásmido libre) de cada colonia fue sometida a PCR según **PCR #2**. La detección del producto de amplificación de **258 pb** se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular.

Para comprobar la presencia del inserto en el plásmido, se tomó una alícuota de 5 μl del producto de amplificación obtenido de la reacción anterior y se realizó una segunda amplificación según **PCR #3**. La detección del producto de amplificación de 212 pb fue realizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular. Finalmente, la confirmación de la secuencia del inserto se realizó mediante secuenciamiento (Macrogen, Korea). Las bacterias conteniendo el plásmido recombinante *TOPO-258* se almacenaron a -80 °C mientras que el plásmido purificado (*TOPO-258*) mediante mini-preps (Promega) se almacenó a -20 °C.

Ic- Diseño y síntesis de la molécula de ADN doble cadena (ADNdc) de 52 pb (ADN-52)

Se diseñaron dos secuencias sintéticas de ADN simple cadena (ADNsc) de 52 bases cada una, complementarias entre sí, una de polaridad positiva (**Hep F**) y otra de

polaridad negativa (**Hep R**) (Fig. 6). La hibridación de las secuencias de ADNsc para formar la hebra de ADNdc de 52 pb se realizó de la siguiente manera: 3 μ l de una solución de 1 μ g/ μ l de cada ADNsc fueron adicionados a 4 μ l de agua c.b.m. hasta un volumen final de 10 μ l. La mezcla se incubó a 97 °C por 10 minutos y posteriormente se dejó enfriar lentamente en el transcurso de 24 h. La hibridación se confirmó mediante la siembra de una alícuota del producto de reacción de hibridación en gel de poliacrilamida al 7%, con un marcador de peso molecular. Los extremos del ADNdc obtenidos contienen una secuencia correspondiente al producto de digestión de la enzima *NheI*, de manera de poder ligar dicho producto en el sitio interno *NheI* presente en la secuencia *ADN-258* clonada en el plásmido recombinante *TOPO-258*.

<p>Hep F 5' CTAGCCGCATGTGCATGATGTCATTAAGCTTTTGGGCATTGCCGCGCAGCAG Hep R 5' CTAGCTGCTGCGCGGCAATGCCAAAAGCTTAATGACATCATGCACATGCGG</p>

Figura 6. Secuencias de los oligonucleótidos **Hep F** y **Hep R** diseñados para sintetizar el **ADNdc de 52 pb**. En negrita se indican los sitios cohesivos protruyentes que genera la enzima *NheI*

Id- Clonación del ADN-52 en TOPO-258 (TOPO-310)

A los fines de clonar el fragmento de *ADN-52* en el plásmido *TOPO-258* una alícuota (200 ng) de una solución de *TOPO-258* fue digerido con *NheI* (Promega) según instrucciones del proveedor. El producto de esta reacción se ligó con el fragmento de *ADN-52* mediante una reacción catalizada por la enzima ligasa (Promega) según la siguiente mezcla: 2 μ l de una solución de *TOPO-258*, 1 μ l de una solución 1/100 del *ADN-52*, 2 μ l de buffer de ligación 5X (Promega), 1 μ l de ligasa y 1 μ l de agua c.b.m., en un volumen final de 10 μ l. La mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche. La ligación se realizó en los sitios cohesivos protruyentes generados previamente por acción de *NheI*. En base a este procedimiento se obtuvo un nuevo plásmido recombinante denominado *TOPO-310* conteniendo una secuencia de 310 bp correspondiente a la región 5'NC del genoma del VHC más la secuencia sintética insertada (Fig. 7). Dicho plásmido recombinante se utilizó para transformar células competentes de *E. Coli* DH5 α acorde al protocolo descrito en Anexo.

Para seleccionar las colonias que incorporaron al plásmido *TOPO-310* se procedió acorde a lo descrito para la selección del plásmido *TOPO-258*. Finalmente, el plásmido purificado *TOPO-310* se almacenó a -20°C .



Figura 7. Secuencia completa del ADN molde (**ADN-310**) correspondiente a la región 5'NC del genoma del VHC más la secuencia sintética insertada, utilizada para sintetizar el ARN del CI. El recuadro encierra la secuencia de 52 nucleótidos insertados (solo se muestra la hebra positiva). Las zonas subrayadas corresponden a los sitios de unión de los oligonucleótidos iniciadores externos (**p1** y **p2**) e internos (**p3** y **p4**). En negrita se indica el sitio de reconocimiento de la enzima *NheI* y con flechas se indican los sitios cohesivos protruyentes generados por la misma.

Ie- Síntesis del ARN del CI

El plásmido *TOPO-310* purificado fue linealizado mediante digestión con la enzima *BamHI* acorde al siguiente protocolo: una mezcla compuesta por $5\ \mu\text{l}$ de *TOPO-310* ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$), $1\ \mu\text{l}$ de *BamHI* ($1000\ \text{U}/\text{ml}$) (Promega); $7,5\ \mu\text{l}$ buffer 10X de reacción (Promega) y $61,5\ \mu\text{l}$ de agua c.b.m. hasta volumen final de $75\ \mu\text{l}$, fue incubada a 37°C por 2 h. La obtención del plásmido lineal se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio. Seguidamente, se precipitó el plásmido lineal (*TOPO-310-BamHI*) de acuerdo al siguiente protocolo: una mezcla compuesta por $55\ \mu\text{l}$ de la solución de *TOPO-310-BamHI* ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$); $5,5\ \mu\text{l}$ de acetato de sodio trihidratado 3 M pH 6 y $110\ \mu\text{l}$ de etanol 96 % frío, fue incubada a -80°C por 30 minutos. Seguidamente la mezcla fue centrifugada a $16.000\ \text{X}\ \text{g}$, se descartó el sobrenadante y el precipitado fue deshidratado en termobloque por 5 minutos. Para realizar la síntesis del ARN/CI se resuspendió el precipitado seco en $15\ \mu\text{l}$ de agua c.b.m, utilizando el siguiente protocolo de transcripción *in vitro*: una mezcla compuesta por $15\ \mu\text{l}$ de solución de ADN molde (*TOPO-310-BamHI*), $3,7\ \mu\text{l}$ DTT 100

mM, 7,3 μ l rNTP's 2,5 mM; 7,3 μ l de buffer de reacción de transcripción 5X (Promega); 1,8 μ l RNAsin 40U/ μ l (Promega) y 1,8 μ l de T7 RNA polimerasa (18 U/ μ l), hasta volumen final de 36,9 μ l; fue incubada a 37 °C por 1 hora.

La totalidad del ARN/CI sintetizado (36,9 μ l) fue sometida a purificación y concentración con fenol-cloroformo 5:1; pH 4,7 (Sigma). El volumen final del ARN/CI purificado fue 300 μ l. 6 alícuotas de 50 μ l del ARN/CI purificado fueron sometidas a una segunda purificación empleando el kit comercial de extracción de ácidos nucleicos virales (QIAmp® Mini Elute® Virus Spin Kit, QIAGEN), de acuerdo al protocolo del fabricante, para obtener finalmente seis alícuotas de 200 μ l de ARN/CI purificado cada una.

Para degradar el ADN molde, se trató la solución de ARN/CI purificado con ADNasa según el siguiente protocolo: una mezcla compuesta por 1,2 ml del ARN/CI purificado, 18 μ l ADNasa (DNase I RNase-free 2.000 U/ml, BioLabs) y 120 μ l de buffer ADNasa I 10X (BioLabs) se incubó a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente se agregó 21 μ l de EDTA 0,5 M pH=8 y fue incubada la preparación a 75 °C por 10 minutos para inactivar la enzima. La solución de ARN/CI se almacenó a -80 °C.

i- Cuantificación del CI. Se realizó mediante Real Time-PCR (qPCR) Applied Biosystem, 7500. La curva de calibración se confeccionó en base a diluciones seriadas de la solución madre de *TOPO-310* cubriendo las siguientes concentraciones de ADN molde: $1,32 \times 10^1$; $1,32 \times 10^2$; $1,32 \times 10^3$; $1,32 \times 10^4$; $1,32 \times 10^5$ y $1,32 \times 10^6$ copias/ μ l. Una alícuota de 2 μ l de la muestra de ARN/CI puro fue sometida a RT de acuerdo al protocolo de **RT #1** (Anexo) (factor de dilución 1/9,5). De manera paralela, se procesó un control negativo, reemplazando los 2 μ l de ARN/CI por agua cbm. Para la amplificación, se utilizó una alícuota de 5 μ l de una dilución 1/100 de la solución de ADNc molde de la muestra a cuantificar, una alícuota de 5 μ l de la solución obtenida del producto de la RT del control negativo y 5 μ l de cada muestra correspondiente a la curva de calibración. La mezcla de reacción para la amplificación fue la siguiente: 5 μ l de ADN molde; 3,75 μ M de **p3**, 3,75 μ M de **p4**; 7,5 μ l de MasterMix y agua cbm hasta un volumen final de 10 μ l. La amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones de ciclado: un paso de desnaturalización inicial de 95 °C por 10 minutos y

posteriormente, 40 ciclos de: desnaturalización del templado (95 °C por 15 seg.), hibridación y extensión de los oligonucleótidos iniciadores (60 °C por 1 minuto.). Se realizó el análisis de la curva de *melting* según las siguientes condiciones térmicas: 1 ciclo de: desnaturalización del producto de amplificación (95 °C por 15 seg.), hibridación (60 °C por 1 minuto.), desnaturalización del producto de amplificación (95 °C por 15 seg.) e hibridación (60 °C por 1 minuto.). La detección de los productos de amplificación fue realizada con SYBR Green. La cuantificación absoluta fue realizada acorde al software provisto por el fabricante. Las muestras, controles y estándares fueron analizados por triplicado.

ii- Almacenamiento del CI. Las soluciones madres y soluciones de trabajo de CI se almacenaron en buffer AVE (Qiagen), en tubos de calidad biología molecular, a -80 °C.

iii- Estabilidad del CI. Se estudió la estabilidad en tiempo real almacenando alícuotas de soluciones de distinta concentración del CI a diferentes temperaturas: muestras de solución madre y solución madre diluida 10^{-2} , fueron estudiadas a -80° C, -20 °C y 4 °C y analizadas por qPCR acorde al protocolo ya descrito. La estabilidad de la solución de trabajo (10^{-4}) conservada a -80 °C fue controlada mediante **Nested-PCR/VHC** acorde al protocolo descrito inicialmente.

II- IMPLEMENTACIÓN DEL CONTROL INTERNO EN LAS TÉCNICAS DE PCR *IN-HOUSE*

IIa- Determinación de la concentración de trabajo de la solución de CI

La técnica estándar en la que fue incluido el CI se define como **Nested-PCR/VHC**, compuesta por las siguientes reacciones secuenciales: RT #1/ PCR #1/ PCR #3 (Anexo).

Para determinar la concentración óptima de CI a emplear se procesaron muestras correspondientes a diluciones seriadas de la solución madre del CI (en un rango de 10^{-1} - 10^{-10}) en presencia de 100 UI/ml de SI ARN/VHC (NIBSC, 96/798). Para tal fin se agregó 1µl de la solución del CI de cada dilución al buffer de lisis

(Qiagen) por cada 200 µl de muestra. Seguidamente, se extrajeron los ácidos nucleicos de las muestras (ARN/VHC y CI) empleando el *kit* comercial de extracción de ácidos nucleicos virales (Qiagen), de acuerdo al protocolo del fabricante. Posteriormente, se empleó una alícuota de 10 µl del ARN extraído de cada muestra para sintetizar el ADNc correspondiente mediante RT, según **RT #1**.

En base a 5 µl del ADNc, se realizó la primera amplificación según **PCR #1** y posteriormente, empleando como molde 5 µl del producto de amplificación, se realizó la segunda amplificación según **PCR #3**. Los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular.

En una segunda etapa, con el propósito de ajustar el rango de concentraciones de la solución de trabajo del CI, se prepararon las siguientes diluciones desde la solución madre: $10^{-3,25}$, $10^{-3,5}$, $10^{-3,75}$, 10^{-4} , $10^{-4,25}$, $10^{-4,50}$ y $10^{-4,75}$. Las diluciones se hicieron en buffer AVE (Qiagen). Para el procesamiento de las muestras, se procedió de la misma manera que en la primera etapa. Una vez optimizado el valor de la concentración de la solución de trabajo, se procedió a la preparación de alícuotas y almacenamiento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

I Ib- Detección de ARN/VHC en plasma humano

Con el propósito de demostrar que la concentración de trabajo de ARN/CI previamente determinada es reproducible en la técnica de **Nested-PCR/VHC**, se analizó un panel de muestras de mezclas de plasma de más de 5.000 unidades y un panel de muestras de mezclas de plasma de 500 unidades, ambos provistos por el Laboratorio de Hemoderivados (LHD). Ambos ensayos se realizaron con y sin el agregado de SI de ARN/VHC (100 UI/ml). Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, en presencia de un marcador de tamaño molecular.

I Ic- Validación de Nested-PCR/VHC

Una vez optimizada la concentración de CI adecuada a la técnica **Nested-PCR/VHC** para la detección del ARN/VHC en mezclas de plasma humano, se

procedió a la validación de la misma, analizando **límite de detección, especificidad y robustez**, según criterios establecidos por organismos europeos (CPMP 1997; EAEMP 1997; EDQM 1998; EDQM 2012).

i- Límite de detección (LD). Se preparó una suspensión viral de referencia de 10.000 UI/ml de ARN/VHC, empleando un SI (NIBSC, 96/798). Partiendo de la misma, se realizaron diluciones semilogarítmicas seriadas en pool de plasma negativo para ARN/VHC, ARN/VIH, AgsVHB, Anti-VIH y anti-VHC hasta obtener las siguientes concentraciones: 1.000; 316; 100; 31,6 y 10 UI/ml. Posteriormente, se acondicionaron las muestras a procesar de la siguiente manera: se agregó 1µl de la solución de trabajo CI (100-200 copias/µl) al buffer de lisis (Qiagen) por cada 200 µl de muestra. Se analizaron 24 muestras de cada concentración en 6 ensayos independientes, en el transcurso de 6 días distintos, mediante la técnica descrita de **Nested-PCR/VHC**. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular. Los mismos fueron interpretados como el número de resultados positivos en relación al número de muestras analizadas. El límite de detección fue calculado empleando el programa estadístico CombiStats (<http://combistats.edqm.eu/>).

ii- Especificidad. La especificidad de la secuencia de los primers fue analizada mediante el software provisto por el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con el mismo objeto, se empleó un panel de referencia internacional, basado en 100 muestras de plasma no reactivas para ARN/VHC provisto por EDQM (Human Plasma Pool samples for Validation of NAT, European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care European Pharmacopoeia), el que fue reconstituido según indicaciones del fabricante. Las muestras fueron analizadas por **Nested-PCR/VHC**. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular.

iii- Robustez. Fue evaluada durante la fase de desarrollo de la validación, en base a distintas variaciones experimentales como concentración de primers,

volumen de reacción, lotes de enzimas y temperaturas de *annealing* (resultados no mostrados).

IId- Detección de los genotipos del VHC

- i. La secuencia de los oligonucleótidos iniciadores p1, p2, p3 y p4 (Anexo) ha sido comparada con un alineamiento de secuencias correspondientes a 44 aislados procedentes de distintas partes del mundo realizado por Bukh y col. (Bukh, Purcell et al. 1992) en base a la región 5'NC.
- ii. La capacidad de la técnica **Nested-PCR/VHC** para detectar los genotipos epidemiológicamente más importantes del VHC fue comprobada mediante el análisis del panel de genotipos provisto por NIBSC (Non WHO Reference Material 2nd HCV RNA Genotype Panel for Nucleic Acid Amplification Techniques, code 08/264). La concentración estimada de cada genotipo, según el fabricante, se encuentra entre 500 y 1.500 UI/ml.

IIE- Detección de ARN/VHC en Hemoderivados: Albúmina Sérica Humana (ASH)

Una alícuota obtenida de un lote de concentrado de ASH producido en el Laboratorio de Hemoderivados de la Universidad Nacional de Córdoba, Argentina (LHD), fue diluido al 5% con agua estéril calidad inyectable. Parte de la misma fue contaminada con el SI de ARN/VHC hasta lograr una concentración de 100 UI/ml de ARN/VHC. Posteriormente, muestras de 200 µl de ASH 5% sin contaminar y contaminadas, fueron co-procesadas de la siguiente manera: se agregó 1µl de la solución de trabajo de CI (100-200 copias/µl) al buffer de lisis y se realizó la purificación de los ácidos nucleicos (Qiagen). Seguidamente, se realizó la amplificación acorde a **Nested-PCR/VHC**.

IIf- Detección de ARN/VIH-1 en plasma humano

La técnica estándar en la que fue incluido el CI se define como **Nested-PCR/VIH-1**, compuesta por las siguientes reacciones secuenciales: **RT #2/ PCR #4/ PCR #5** (Anexo).

Se prepararon muestras de 37 UI/ml, 100 UI/ml, 108 UI/ml, 216 UI/ml y 316 UI/ml de ARN/VIH diluyendo un estándar internacional de ARN/VIH-1 (2nd International Standard International Standard HIV-1 RNA, code 97/650 WHO/NIBSC, UK) y muestras de un estándar secundario (HIV-1 RNA Working Reagent 1 for NAT Assays NIBSC) de baja (363 UI/ml), media (3.631 UI/ml) y alta (36.308 UI/ml) concentración de ARN/VIH-1. Con el propósito de concentrar las partículas virales, se centrifugó 1 ml de cada muestra a 18.000 rpm, a 2 °C, durante 45 minutos, previo agregado de 10 µl de *yeast* t-RNA (Invitrogen) 5 µg/µl por cada muestra, como agente co-precipitante de ácidos nucleicos, descartando finalmente 750 µl de cada sobrenadante. Seguidamente, se realizó la extracción de los ácidos nucleicos (VIH-1 y CI) en base a los 200 µl restantes, previo agregado de 1µl de la solución de trabajo de CI (100-200 copias/µl) al buffer de lisis (Qiagen) por cada muestra, empleando el *kit* comercial (Qiagen). Tomando 20 µl del ARN extraído como molde, se sintetizó el ADNc mediante la reacción de **RT #2** (Anexo). En base a una alícuota de 5 µl del ADNc, se realizó la primera amplificación según **PCR #4** (Anexo), y posteriormente, empleando como molde 5 µl del producto de amplificación se realizó la segunda amplificación con oligonucleótidos internos según **PCR #5**. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, en presencia de un marcador de tamaño molecular.

Iig- Validación de Nested-PCR/VIH-1

i- Límite de detección (LD). Se procedió de la misma manera que para la validación para VHC, pero empleando un SI de referencia de ARN/VIH-1 (NIBSC 97/650), aplicando los protocolos de reacción correspondientes a **Nested-PCR/VIH-1**.

ii- Especificidad. La especificidad de la secuencia de los primers fue analizada mediante el software provisto por el NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Si bien actualmente no existe disponibilidad de un panel de referencia de muestras negativas para

ARN/VIH-1, se empleó el mismo panel de referencia usado para VHC (las muestras fueron analizadas previamente como negativas para ARN/VIH-1).

iii- Robustez. Fue evaluada durante la fase de desarrollo, en base a distintas variaciones experimentales como concentración de primers, volumen de reacción, lotes de enzimas y temperaturas de *annealing* (resultados no mostrados).

IIIh- Detección de los genotipos del VIH-1

Se analizó un panel de muestras correspondientes a los principales genotipos del VIH-1 provisto por el NIBSC (código 08/358) mediante la técnica validada ya descrita (**Nested-PCR /VIH-1**). Este panel contiene los siguientes genotipos: grupo M (subtipos A, B, C, D, F, G, AE recombinante y AA-GH recombinante), grupo N y grupo O. Según el fabricante, la concentración estimada de cada genotipo se encuentra entre 2.000 y 10.000 copias/ml. Las muestras se acondicionaron de acuerdo al protocolo del fabricante y las mismas se procesaron sin previa dilución.

IIIi- Detección de ARN/VIH-1 en Hemoderivados

i- Antitrombina III (ATIII) y Gammaglobulina Antitetánica Intramuscular (GA)

Concentrado de ATIII liofilizado fue reconstituido con agua calidad inyectable de acuerdo especificaciones del fabricante (LHD). Concentrado de GA (LHD) fue acondicionado para el análisis. Muestras de ATIII y de GA fueron contaminadas con el SI ARN/VIH-1 (NIBSC, 97/650) hasta lograr una concentración de 492 UI/ml de ARN/VIH-1. ARN/VIH-1 y posteriormente analizados mediante la **Nested-PCR/VIH-1**.

ii- Complejo Protrombínico (CPR) y Gammaglobulina Endovenosa Líquida (IVL)

Concentrado de CPR liofilizado fue reconstituido con agua calidad inyectable de acuerdo especificación del fabricante (LHD). Concentrado de IVL (LHD) fue acondicionado para el análisis. Muestras de CPR e IVL fueron contaminadas con el SI

ARN/VIH-1 (NIBSC, 97/650) hasta obtener una concentración de 492 UI/ml de ARN/VIH-1 y posteriormente analizados mediante la **Nested-PCR/VIH-1**.

IIj- Detección simultánea del ARN/VHC y ARN/VIH-1 en plasma humano

La técnica estándar en la que fue incluido el CI se define como *multiplex Nested-PCR/VHC+VIH-1*, compuesta por las siguientes reacciones secuenciales: **RT #2/ PCR #6/ PCR #7** (Anexo).

Se preparó una suspensión de referencia concentrada mezclando ambos SI (ARN/VHC y ARN/VIH-1). Seguidamente, empleando plasma humano negativo para ARN/VHC, ARN/VIH-1, AgsVHB, Anti-VIH y anti-VHC, se realizaron diluciones de la misma hasta obtener las siguientes concentraciones: 100 UI/ml y 200 UI/ml, 150 UI/ml y 300 UI/ml, 500 UI/ml y 1.000 UI/ml; de ARN/VHC y ARN/VIH-1, respectivamente. Se agregó 1 µl de la solución de trabajo del CI al buffer de lisis (Qiagen) por cada 200 µl de muestra. Seguidamente, se extrajeron los ácidos nucleicos de las muestras (ARN VHC, VIH-1 y CI) empleando el *kit* comercial (Qiagen). Tomando 20 µl del ARN extraído como molde, se sintetizó el ADNc mediante la reacción de **RT #2**. Una alícuota de 5 µl del ADNc fue utilizada para la primera amplificación según **PCR #6** (Anexo) y 5 µl del producto de amplificación fue utilizado para la segunda amplificación con oligonucleótidos internos según **PCR #7**. Los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, en presencia de un marcador de tamaño molecular.

RESULTADOS

I- ANALISIS DE CALIDAD DE LA MOLÉCULA DE ARN/CI

Previo a la incorporación del CI a las técnicas de análisis, se verificó la calidad de la síntesis del mismo en función a los siguientes parámetros:

- Presencia de ARN/CI específico posterior a la síntesis.
- Ausencia del ADN molde utilizado en la construcción del CI.
- Cuantificación del CI mediante qPCR.
- Almacenamiento y estabilidad del CI.

Ia- Presencia del ARN/CI específico

Se realizó la **Nested-PCR/VHC**, partiendo de distintas alícuotas (0,25; 0,5; 1; 1,5 y 2 μ l) de la solución madre de ARN/CI. Los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular (Fig. 8). La detección del producto de amplificación de 264 pb indica que es posible amplificar el CI específico, independientemente de la concentración utilizada. Todas las alícuotas analizadas fueron positivas para el producto de 264 pb.

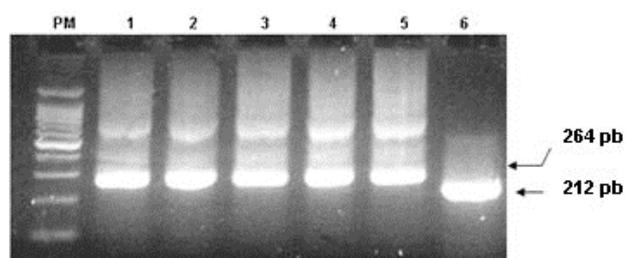


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 2.3% de los productos de amplificación de distintas alícuotas de 0,25 μ l (**Línea 1**); 0,5 μ l (**Línea 2**); 1 μ l (**Línea 3**); 1,5 μ l (**Línea 4**) y 2 μ l (**Línea 5**) de la solución madre de ARN/CI. **Línea 6.** Control positivo de PCR (ADNc positivo para la secuencia de ADN-212 pb obtenido a partir de un SI de ARN/VHC de 1.000 UI/ml). **PM.** Marcador de tamaño molecular (la señal de mayor intensidad corresponde a 500 pb).

Ib- Ausencia del ADN molde

Para confirmar que el producto amplificado corresponde al ARN del CI y no a al ADN molde residual utilizado para la obtención del mismo, se verificó la degradación total del ADN molde en la solución madre de ARN/CI. Para tal fin, distintas alícuotas (0,3; 0,5; 1 y 2 μ l) de la solución madre de ARN/CI fueron sometidas a PCR acorde al protocolo de la **reacción PCR #3**, omitiendo la reacción de transcripción reversa (para completar el volumen de ARN requerido por el protocolo **PCR #3**, se agregó cantidad suficiente de agua cbm para 5 μ l). Los resultados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2,3%, teñido con bromuro de etidio, con un marcador de tamaño molecular (Fig. 9). Las alícuotas tratadas con ADNasa no revelaron la presencia del producto de amplificación de 264 pb, indicando la degradación total del ADN molde.

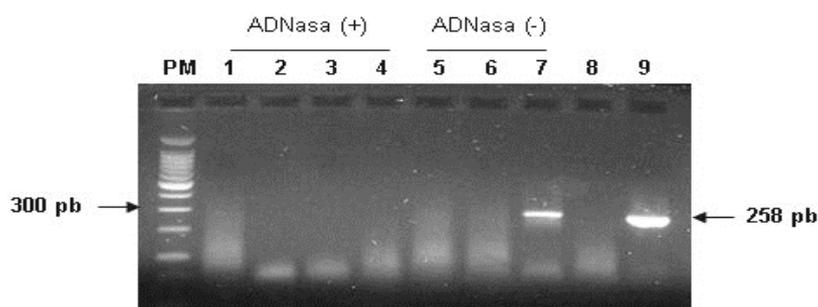
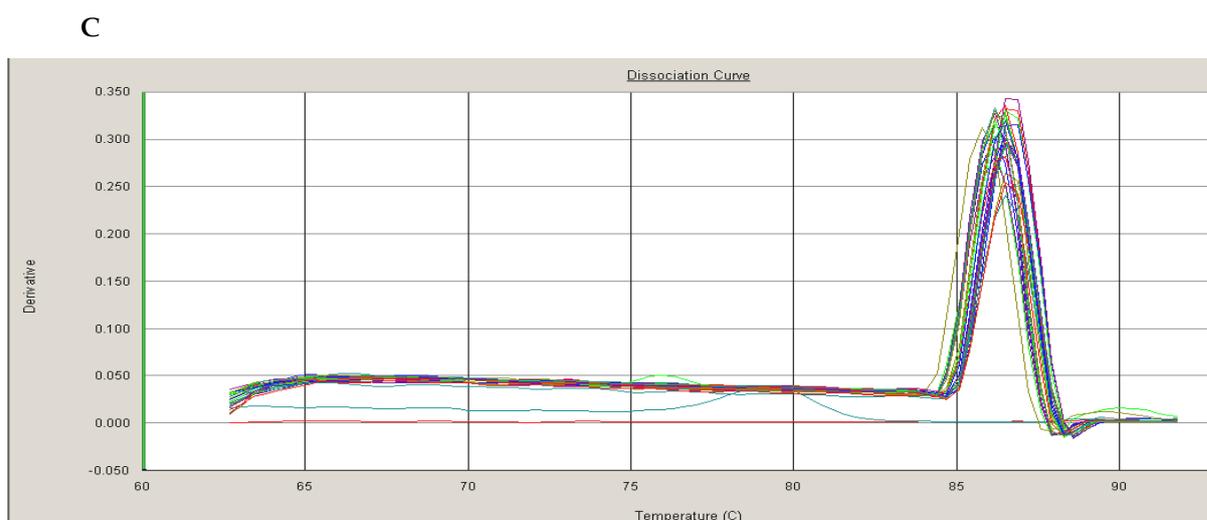
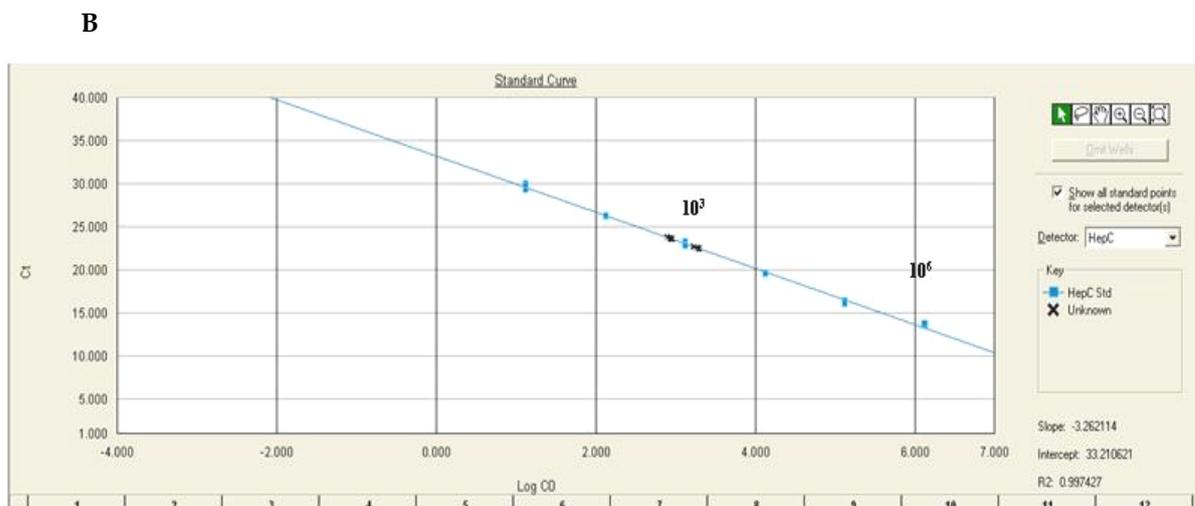
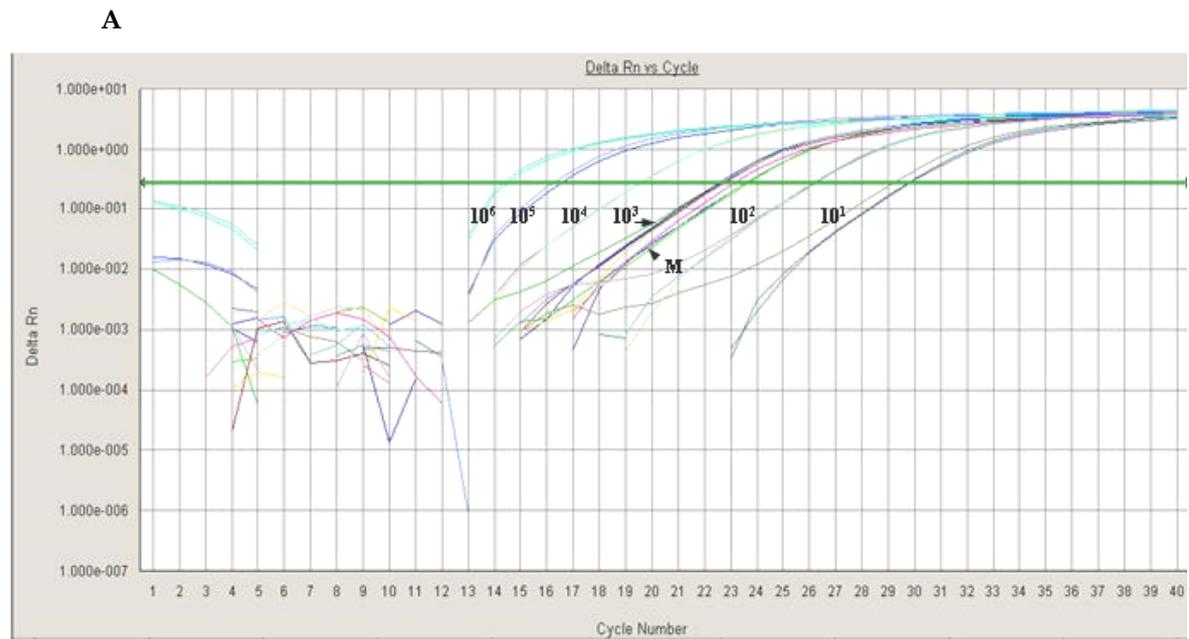


Figura 9. Ausencia de ADN molde en la solución madre de ARN/CI. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación de distintas alícuotas de 0,3; 0,5; 1 y 2 μ l de la solución de ARN/CI tratadas (Líneas 1 - 4) y 0,3; 0,5 y 1 μ l no tratadas (Líneas 5 - 7) con ADNasa. Línea 8. Control negativo de PCR. Línea 9. Control positivo de PCR (ADNc positivo para secuencia de ADN-258). Se indica con flecha el producto de amplificación de 300 pb, próximo al de 258 pb. PM: Marcador de tamaño molecular.

Ic- Cuantificación del CI

Las figuras (10A, 10B y 10C) muestran las curvas de calibración, y *melting* obtenidas para las diferentes diluciones de la solución estándar del CI. La concentración estimada de la solución madre del ARN/CI fue de $1,32 \times 10^6$ copias/ μ l.



Figuras 10. A y B. Curvas de amplificación, obtenidas por qPCR para la cuantificación del CI. Las curvas corresponden a $10^1= 1,32 \times 10^1$; $10^2=1,32 \times 10^2$; $10^3=1,32 \times 10^3$; $10^4=1,32 \times 10^4$; $10^5=1,32 \times 10^5$;

$10^6=1,32 \times 10^6$ copias/ μ l del plásmido TOPO-310 y a la solución concentrada de CI (M). C. Curvas de *melting* de los respectivos amplicones mostrados en A y B.

Id- Almacenamiento y Estabilidad del CI

Los ensayos realizados indican que la solución madre del CI demostró ser estable al menos 3 meses a -20 °C y al menos 1 mes a 4 °C. Alícuotas de una dilución 10^{-2} de la solución madre ($\sim 1,3 \times 10^4$ copias/ μ l) demostraron ser estables 1 año a -80 °C, 3 meses a -20 °C y 1 mes a 4 °C. Alícuotas de la solución de trabajo CI (dilución 10^{-4} de la solución madre $\sim 100-200$ copias/ μ l) demostraron ser estables por 3 meses a -80 °C (resultados no mostrados).

II-IMPLEMENTACIÓN DEL CONTROL INTERNO EN LAS TÉCNICAS DE PCR "IN HOUSE"

A continuación se describen los experimentos y resultados obtenidos de la optimización para la incorporación del CI a las técnicas de análisis **Nested-PCR/VHC**, **Nested-PCR/VIH-1** y *múltiple* **Nested-PCR/VHC+VIH-1**, la validación de las mismas y la implementación en el control de calidad del plasma y HD.

Iia- Determinación de la concentración de trabajo de la solución de CI

Debido a que en la **Nested-PCR/VHC** el CI compite con la secuencia del ARN/VHC por los oligonucleótidos iniciadores, resultó imprescindible optimizar tanto, la cantidad de moléculas de CI a adicionar a la muestra a analizar como las condiciones experimentales óptimas (Hoorfar, Malorny et al. 2004). La determinación de la concentración de trabajo del CI se basó en criterios analíticos establecidos en las regulaciones internacionales vigentes para el análisis de mezclas de plasma destinadas a la producción de HD (EAEMP 1997; EDQM 2012), mediante los cuales se debe garantizar la detección de 100 UI/ml de ARN/VHC presentes en una muestra. Ciertos criterios pueden resumirse:

- i. En una muestra, en la cual coexistan moléculas de ARN/VHC y de ARN/CI, la eficiencia de amplificación del ARN/VHC de un SI de 100 UI/ml debe ser mayor a la del CI.
- ii. En una muestra, en la cual solo existan moléculas de ARN/CI, (negativas para ARN/VHC), la eficiencia de amplificación debe ser la óptima para detectar el producto de amplificación correspondiente.
- iii. En muestras con alta carga viral (ARN/VHC), la eficiencia de amplificación del ARN/VHC será mayor a la del ARN/CI, por lo que es predecible que la señal del CI no sea detectada, debido a la competencia. El resultado es válido (Hoorfar, Malorny et al. 2004).

Los resultados se evaluaron en base a la eficiencia de amplificación del SI de 100 UI/ml en relación a la concentración de CI adicionado. Los resultados indican que la concentración óptima de CI corresponde a la dilución 10^{-4} (expresado como -4,0 en la imagen) de la solución madre de CI (Fig. 11). Este punto óptimo se aproxima a concentraciones equimoleculares de los productos de amplificación del CI y del SI.

Se muestran los resultados obtenidos de la segunda etapa.

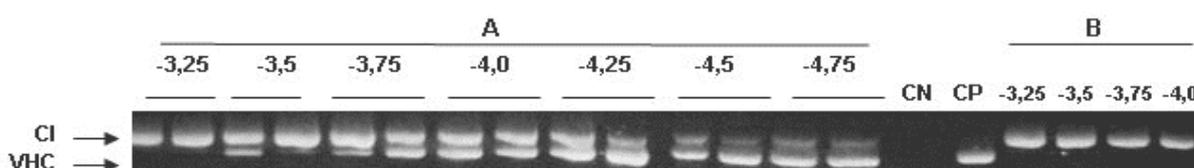


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa al 2.3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VHC** de muestras conteniendo: **A)** 100 UI/ml del SI de ARN/VHC y distintas cantidades de ARN/CI, procesadas por duplicado; **B)** Distintas cantidades de ARN/CI. CN: Control negativo (plasma negativo sin ARN/VHC y sin ARN/CI). CP: Control positivo (100 UI/ml ARN/VHC de SI sin ARN/CI).

I**ib**- Detección de ARN/VHC en plasma humano

Mezclas de plasma de más de 5.000 unidades:

Se utilizaron dos muestras diferentes, denominadas "A" y "B" (Fig. 12). El ARN viral (100 UI/ml) adicionado a las mezclas de plasma pudo ser detectado en presencia del CI (100-200 copias/ μ l de ARN/CI) (líneas 5 y 8). Además, el CI pudo ser detectado en las muestras libres de ARN/VHC (líneas 2-4, 6 y 7) (resultados negativos verdaderos). El control negativo compuesto por plasma libre de ARN/VHC y CI confirma la ausencia de contaminación cruzada (línea 9).

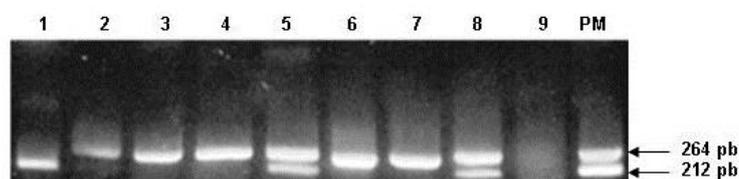


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VHC** en grandes mezclas de plasma humano. **Línea 1:** control positivo conformado por un estándar de ARN/VHC 100 UI/ml sin el agregado de CI. **Línea 2:** 100-200 copias/ μ l de ARN/CI adicionado a plasma humano libre de ARN/VHC. **Líneas 3 y 4:** réplicas de una muestra "A" libre de ARN/VHC más el agregado de CI. **Línea 5:** muestra "A" contaminada con estándar de ARN/VHC hasta una concentración de 100 UI/ml, más el agregado de CI. **Líneas 6 y 7:** réplicas de una muestra "B" libre de ARN/VHC más el agregado de CI. **Línea 8:** muestra "B" contaminada con estándar de ARN/VHC hasta una concentración de 100 UI/ml, más el agregado de CI. **Línea 9:** control negativo conformado por plasma humano libre de ARN/VHC, sin el agregado de CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente a fragmentos de ADN de 264 pb (CI) y 212 pb (VHC).

Mezclas de plasma de 500 unidades:

Si bien la FE exige el análisis por NAT en las mezclas totales de plasma destinadas a la producción de HD (> 1.000 unidades), la industria emplea el análisis en mezclas de plasma conformadas por menor cantidad de unidades, como ser mezclas entre 10 y 500 unidades. Esto permite mejorar la probabilidad de detectar una donación contaminante en relación al límite de detección de las técnicas disponibles y el efecto de dilución resultante de las grandes mezclas, además de evitar el descarte de plasma. Además, esta modalidad de trabajo permite identificar

la unidad contaminante, si es que la hubiera, de manera más práctica y rápida ahorrando tiempo y recursos, ya que se evita la contaminación de la mezcla mayor.

Los resultados indican la completa recuperación del CI en todas las muestras analizadas (Fig. 13, líneas 1-16).

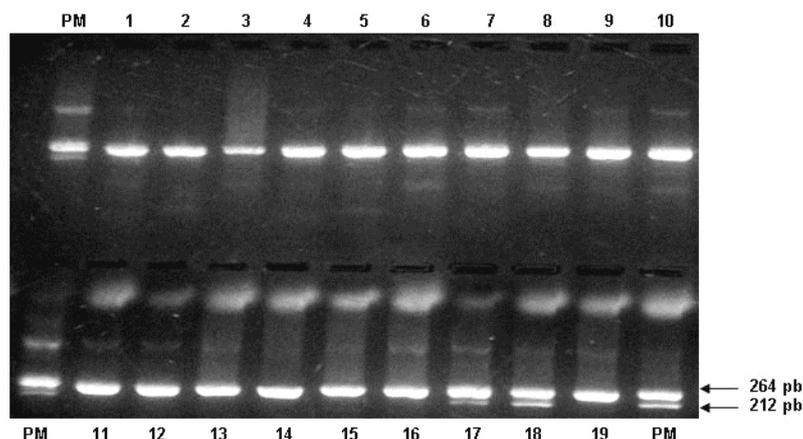


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VHC** en mezclas de plasma humano de 500 unidades. **Línea 1-16:** muestras de plasma de 500 unidades con el agregado de CI. **Línea 17-18:** controles positivos conformados por un estándar de ARN/VHC 100 UI/ml más el agregado de CI. **Línea 19:** plasma humano libre de ARN/VHC con el agregado de CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente a fragmentos de ADN de 264 pb (CI) y 212 pb (VHC).

IIc- Validación de Nested-PCR/VHC

i- Límite de detección. El valor del límite de detección obtenido fue de **52,7 UI/ml ARN/VHC** (38,0 UI/ml - 100,8 UI/ml).

ii- Especificidad. La técnica demostró ser específica de acuerdo a los siguientes resultados:

El análisis realizado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) reveló que los cuatro oligonucleótidos iniciadores de la reacción de PCR hibridan con una zona perteneciente a la secuencia altamente conservada de la región 5'NC del genoma del VHC con una especificidad del 100%.

Las 100 muestras de plasma libre de virus resultaron ser negativas para ARN/VHC.

IId- Detección de los genotipos del VHC de importancia epidemiológica

Uno de los requerimientos exigidos para la detección del ARN/VHC por NAT es que las técnicas tengan la capacidad para detectar los 6 mayores genotipos del VHC, con equivalente sensibilidad. El panel de genotipos de ARN/VHC provisto por NIBSC ha sido analizado para tal propósito (código 08/264). Cada panel consiste en 6 viales que contienen los 6 genotipos más importantes (1a, 2b, 3a, 4a, 5 y 6a) (NIBSC, Health Protection Agency, ENG 3QG, United Kingdom).

En la figura 14 se observan los resultados obtenidos de dicho ensayo demostrando que los seis genotipos del panel han sido detectados satisfactoriamente.

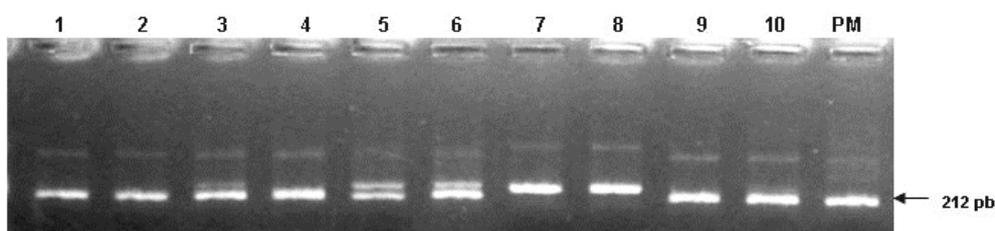


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación del panel de genotipos de VHC provistos por NIBSC mediante Nested-PCR/VHC (500-1.500 UI/ml). **Línea 1:** genotipo 1a más el agregado del CI. **Línea 2:** genotipo 2b más el agregado del CI. **Línea 3:** genotipo 3a más el agregado del CI. **Línea 4:** genotipo 4a más el agregado del CI. **Línea 5:** genotipo 5 más el agregado del CI. **Línea 6:** genotipo 6a más el agregado del CI. **Línea 7 y 8:** plasma libre de ARN/VHC más el agregado de CI. **Línea 9 y 10:** control positivo conformado por plasma humano contaminado con 10.000 UI/ml de un estándar de ARN/VHC más el agregado de CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente al fragmento de ADN de 212 pb (VHC).

Ile- Detección de ARN/VHC en Hemoderivados: Albúmina Sérica Humana (ASH)

Si bien la detección de ácidos nucleicos virales en ASH no es un requerimiento de calidad según FE, la industria farmacéutica de los HD la adoptó como parte del control de calidad de sus productos. La concentración de proteínas en concentrados de ASH se encuentra aproximadamente en 20%, valor superior al

plasmático, por lo que fue necesario adaptar la técnica para aplicarla en estas matrices. La optimización en la concentración proteica durante el método de extracción de los ácidos nucleicos fue el parámetro crítico de mayor consideración. Mediante ensayos realizados con distintas concentraciones de ASH se definió que las muestras de concentrados de ASH deben ser diluidas a una concentración proteica \leq 5%, para lograr una eficiente purificación de los ácidos nucleicos (preparados de ASH con una concentración proteica mayor al 5% dificultó el pasaje de los líquidos - muestra, buffer, etanol- a través de las membranas de sílica, resultados no mostrados).

Los resultados indican que tanto el CI como el ARN/VHC pudieron ser procesados y detectados a partir de una matriz de ASH al 5% (Fig. 15). El ARN/VHC, presente en la muestra de ASH contaminada, pudo ser detectado en presencia del CI (línea 4). El CI pudo ser detectado en las muestras de ASH libres de ARN/VHC, demostrando ausencia de inhibidores -resultado negativo verdadero- (líneas 2 y 3). El resultado del control negativo (ASH libre de ARN/VHC y CI) (línea 5) confirma la ausencia de contaminación cruzada. Cabe destacar que para evitar diferencias de matriz entre distintos lotes de ASH, todas las muestras procesadas provinieron del mismo lote. (Notar en la línea 1 que si bien no se evidencia claramente la presencia del producto de amplificación del CI, no se invalida el resultado positivo para ARN/VHC).

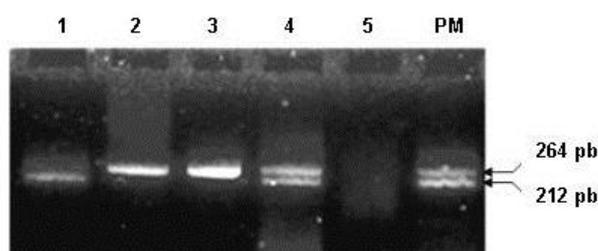


Figura 15. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VHC** en ASH. **Línea 1:** control positivo correspondiente al estándar de ARN/VHC de 100 UI/ml con el agregado del CI. **Línea 2 y 3:** réplicas de una muestra "A" correspondiente a un lote de ASH al 5% con el agregado del CI. **Línea 4:** muestra "A" contaminada con 100 UI/ml de estándar de ARN VHC más el agregado del CI. **Línea 5:** muestra "A" sin el agregado de ARN/VHC y sin el agregado del CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente a fragmentos de ADN de 264 pb (CI) y 212 pb (VHC).

IIf-Detección de ARN/VIH-1 en plasma humano

La detección del ARN/VIH por NAT en mezclas de plasma para la producción de HD no constituye aún un requerimiento de calidad, según la FE (EDQM 2012). No obstante, la industria farmacéutica de los HD ya optó por su incorporación, debido a que la implementación de la misma contribuye a optimizar la seguridad del plasma, especialmente en situaciones de período de ventana serológica de los donantes. Si bien el CI fue diseñado en base a una secuencia específica del ARN/VHC, el mismo fue adaptado para incorporarlo a una técnica de RT-Nested PCR para la detección de ARN/VIH-1 (**Nested-PCR/VIH-1**) en la que el CI es co-amplificado de manera no competitiva con el ARN/VIH-1. Los resultados demuestran que tanto el CI como el ARN/VIH-1 pudieron ser detectados en plasma humano (Fig. 16).

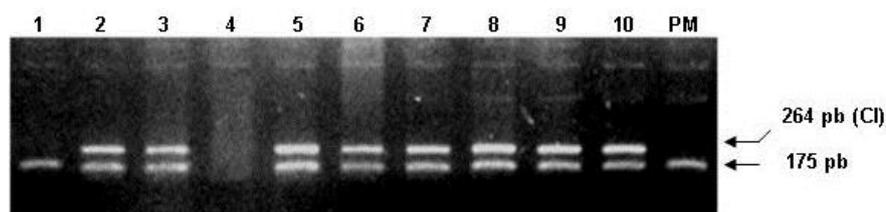


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VIH-1** en plasma humano. **Línea 1:** estándar de ARN/VIH-1 100 UI/ml sin el agregado de CI. **Línea 2:** estándar de ARN/VIH-1 100 UI/ml más el agregado del CI. **Línea 3:** estándar de ARN/VIH-1 316 UI/ml más el agregado del CI. **Línea 4:** control negativo compuesto por plasma no reactivo para ARN/VIH-1 sin el agregado de CI. **Líneas 5, 6 y 7:** estándar de trabajo ARN/VIH-1 en plasma humano: 36.308 UI/ml 363 UI/ml y 3.631 UI/ml, y, respectivamente; más el agregado de CI. **Línea 8:** plasma con 216 UI/ml ARN/VIH-1 más el agregado de CI. **Línea 9:** plasma con 108 UI/ml ARN/VIH-1 más el agregado de CI. **Línea 10:** plasma con 37 UI/ml ARN/VIH-1 más el agregado de CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente a 175 pb, específico del ARN/VIH-1.

IIfg- Validación de la Nested-PCR/VIH-1

La FE no exige el control por NAT del ARN/VIH-1 en mezclas de plasma humano utilizados en la producción de HD. Sin embargo, y teniendo en cuenta las recomendaciones de ICH en cuanto a la validación de NAT para VHC, se realizó la

validación teniendo en cuenta los atributos analíticos que avalan la confiabilidad del método: **límite de detección, especificidad y robustez.**

i- Límite de detección. El valor obtenido del límite de detección fue de **164,2 UI/ml ARN/VIH-1** (95,7 UI/ml - 413,8 UI/ml).

ii- Especificidad. La técnica demostró ser específica de acuerdo a los siguientes resultados: el análisis realizado (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) reveló que los cuatro oligonucleótidos iniciadores de la reacción de PCR hibridan con una zona relativamente conservada de la región *pol* del genoma del VIH-1, con una especificidad del 100%; y las 100 muestras de plasma libre de ARN/VIH-1 provistas por EDQM resultaron ser negativas por RT-Nested PCR.

IIIh- Detección de los genotipos del VIH-1

Si bien los oligonucleótidos iniciadores de la reacción de obtenidos por **Nested-PCR/VIH-1** validada hibridan con una secuencia relativamente conservada de la región *pol* del genoma del VIH-1, fue necesario demostrar la capacidad de detección de los principales genotipos mediante el análisis de un panel de muestras que contempla al grupo M y sus subtipos A, B, C, D, F, G, AE (recombinante) y AA-GH (recombinante); al grupo N y al grupo O, así como también al 3º SI ARN/VIH-1. En el ensayo se demuestra que la técnica es capaz de detectar todos los subtipos del grupo M presentes, así como también los grupos N y O (Fig. 17). En el caso del grupo N, se evidencia una disminución en la eficiencia de amplificación, representada por un producto de amplificación detectado con menor intensidad. Este resultado puede ser explicado por la presencia de *mismatches* (hibridaciones inespecíficas) entre la secuencia del ARN de este genotipo y los oligonucleótidos p5, p6 y p7.

Además, se participó en el estudio colaborativo internacional para establecer el segundo panel de referencia de subtipos de VIH-1 (NIBSC 2nd WHO HIV-1 NAT Subtype Panel) para ser comercializado durante el año 2013.

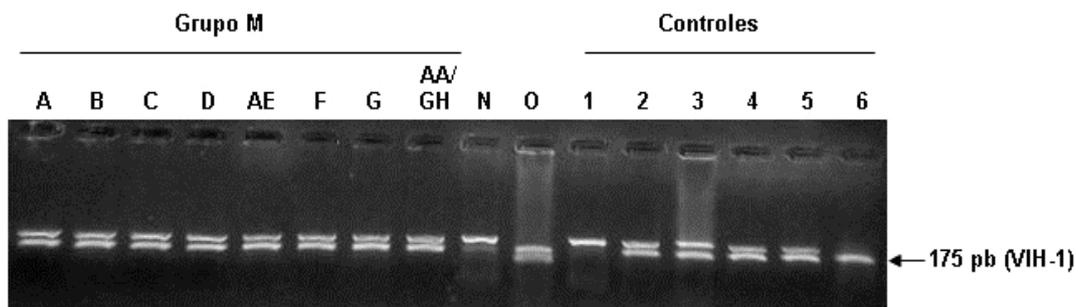


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VIH-1** para la detección de los genotipos del ARN/VIH-1 del grupo M: (subtipos A, B, C, D, AE, F, G, AA/GH), grupo N y grupo O, en plasma humano (2.000-10.000 copias/ml). Controles: plasma negativo para ARN/VIH-1 más el agregado del CI (**Línea 1**); estándar de ARN/VIH-1 de 363 UI/ml más el agregado de CI (**Línea 2**); plasma humano con 100 UI/ml (**línea 3**), 316 UI/ml (**línea 4**) y 1.000 UI/ml (**línea 5**) de SI ARN/VIH-1 mas el agregado del CI; marcador de tamaño molecular correspondiente a 175 pb específico del ARN/VIH-1 (**Línea 6**).

III-Detección de ARN/VIH-1 en Hemoderivados

i- Antitrombina III (ATIII) y Gamaglobulina Antitetánica Intramuscular (GA)

Si bien la detección de ácidos nucleicos virales en ATIII y GA no es un requerimiento de calidad según FE, la industria farmacéutica de los HD la adoptó como parte del control de calidad de sus productos. Los resultados indican que tanto el CI como el ARN/VIH-1 pudieron ser detectados en una matriz de ATIII y GA (Fig. 18).

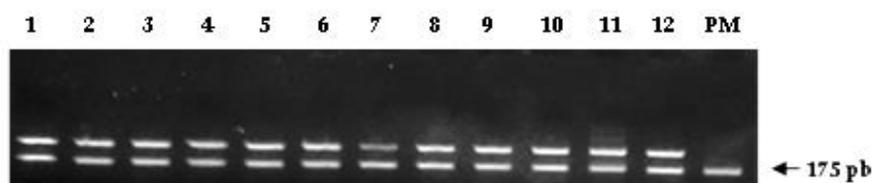


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VIH-1** en ATIII y GA. **Líneas 1 a 6:** réplicas de una muestra de ATIII contaminada con estándar de ARN/VIH-1 de 492 UI/ml más el agregado del CI. **Líneas 7 a 12:** réplicas de una muestra de GA contaminada con estándar de ARN/VIH-1 de 492 UI/ml más el agregado del CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente a 175 pb, específico del ARN/VIH-1.

ii- Complejo Protrombínico (CPR) y Gammaglobulina Endovenosa Líquida (IVL)

De la misma manera que lo mencionado para otros HD, la detección del ARN/VIH-1 en CPR e IVL no es aún un requerimiento de calidad, a pesar de ello la industria farmacéutica de los HD la adoptó como parte del control de calidad de sus productos.

Los resultados indican que tanto el CI como el ARN/VIH-1 pudieron ser detectados en una matriz de IVL y CPR (Fig. 19).

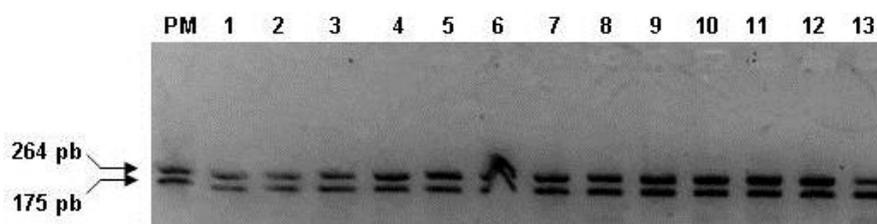


Figura 19. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por **Nested-PCR/VIH-1** en CPR e IVL. **Líneas 1 a 7:** réplicas de una muestra de IVL contaminada con estándar de ARN/VIH-1 de 492 UI/ml más el agregado del CI. **Líneas 8 a 13:** réplicas de una muestra de CPR contaminada con estándar de ARN/VIH-1 de 492 UI/ml más el agregado del CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente a 175 pb, específico del ARN/VIH-1 y 264 pb, específico del CI.

IIIk- Detección simultánea de ARN/VHC y ARN/VIH-1 en plasma humano (*multiplex Nested-PCR/VHC+VIH-1*)

La detección simultánea del ARN/VHC y ARN/VIH-1 representa una opción de grandes ventajas para la implementación de un sistema de *screening* aplicado a un gran número de muestras de plasma o suero humano como puede ser en bancos de sangre y laboratorios productores de HD. La técnica ha sido optimizada de manera tal que permita la detección e identificación simultánea del ARN/VHC, ARN/VIH-1 y ARN/CI. El significado analítico-clínico de la presencia de los dos marcadores virales en una misma muestra puede estar relacionado a un estado de co-infección cuando el ensayo se aplica en bancos de sangre (en el caso de donación individual), mientras

que en la industria productora de HD, la contaminación con los dos marcadores virales en una misma mezcla de plasma puede ser producto de donantes diferentes. La implementación de la técnica de detección simultánea de los dos marcadores permite optimizar los tiempos de análisis, así como también los recursos, en relación al análisis por técnicas separadas. La figura 20 muestra un ensayo representativo en el cual se evaluó la detección e identificación simultánea en plasma humano del ARN/VHC y el ARN/VIH-1 en concentraciones bajas y medias, en presencia del CI.

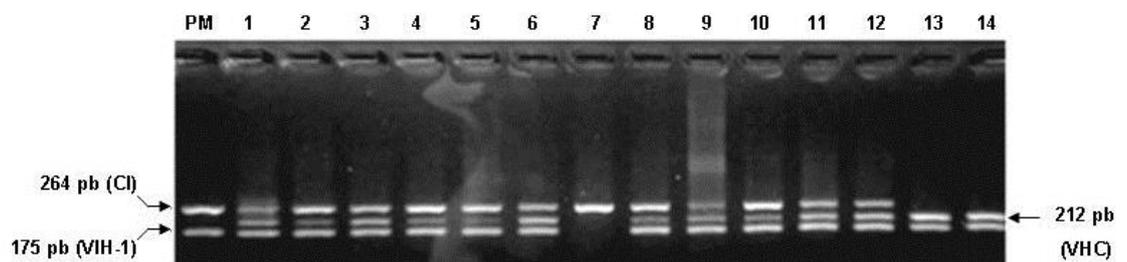


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación obtenidos por *multiplex Nested-PCR/VHC+VIH-1* para la detección e identificación simultánea del ARN/VIH y ARN/VHC en plasma humano. **Líneas 1 a 6:** réplicas de una muestra de plasma humano co-contaminada con SI de ARN/VHC y ARN/VIH a una concentración final de 100 UI/ml y 200 UI/ml, respectivamente; más el agregado de CI. **Línea 7:** control negativo compuesto por plasma humano libre de ARN/VHC y ARN/VIH, con el agregado de CI. **Líneas 8 a 12:** réplicas de una muestra de plasma humano co-contaminada con SI de ARN/VHC y ARN/VIH a una concentración final de 150 UI/ml y 300 UI/ml, respectivamente; más el agregado de CI. **Líneas 13 y 14:** réplicas de una muestra de plasma humano co-contaminada con SI de ARN/VHC y ARN/VIH a una concentración final de 500 UI/ml y 1.000 UI/ml, respectivamente; más el agregado de CI. **PM:** marcador de tamaño molecular correspondiente a fragmentos de ADN de 264 pb (CI) y 175 pb (VIH).

Los resultados indican que tanto el ARN/VHC como el ARN/VIH-1 y el ARN/CI pudieron ser extraídos y detectados a partir de plasma humano. También se observa que concentraciones bajas de ARN/VHC y ARN/VIH-1 (100 y 200 UI/ml, respectivamente) pudieron ser detectadas en presencia del ARN/CI. Es de esperar que a concentraciones virales altas, la señal del CI no pueda ser detectada (líneas 13 y 14), resultado de la competencia por los oligonucleótidos que hibridan con ARN/VHC así como también de la competencia por reactivos generales. A pesar de

ello, no se afecta el propósito analítico del empleo del CI. El resultado del control negativo para las secuencias diana (plasma libre de ARN/VHC y ARN/VIH-1) confirma la ausencia de contaminación cruzada (línea 7).

III- Aseguramiento de la Calidad en las técnicas desarrolladas

La participación en programas externos de aseguramiento de la calidad es muy importante para garantizar la eficiencia en el funcionamiento del sistema de análisis, no sólo en la fase analítica sino también en el proceso completo que involucra desde la recepción del material hasta el informe de los resultados (Pisani, Marino et al. 2008). El monitoreo periódico del funcionamiento de las técnicas posterior a la validación es imprescindible, especialmente durante el período de ejecución de las mismas. Mediante la participación en estos programas es posible detectar de manera temprana errores sistemáticos y de precisión, no poco frecuentes en las técnicas de amplificación, y también mantener una permanente actualización respecto de las nuevas especies virales circulantes. En conjunto, estos programas evalúan la *performance* de los métodos de análisis, ya sea comerciales o *in-house*, y permiten la comparación entre distintos laboratorios. Las técnicas descritas en este trabajo fueron evaluadas en los programas internacionales detallados debajo y los resultados fueron altamente satisfactorios.

- **External Quality Assesment Study (EQA):** Programa del Istituto Superiore di Sanita, Roma, Italia, dirigido a productores de HD de todo el mundo: EQA/3 (2001): EQA/4 (2002) EQA/5 (2003),
- **Programma ufficiale di Valutazione Esterna di Qualità (VEQ):** VEQ/ 2010.
- **European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - Proficiency Testing Scheme (EDQM - PTS):** EDQM 2009/ PTS 109 HCV-NAT.
- **International Collaborative Study to Establish the 2nd WHO International Subtype Reference panel for HIV-1 NAT Assays -EXPERT COMMITTEE ON BIOLOGICAL STANDARDIZATION** Geneva, 15 to 19 October 2011, World

Health Organization 2012 C L Morris, E Wigglesworth and A B Heath Divisions of Retrovirology and Biostatistics, National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC), Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QG, UK.

- **European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare - Proficiency Testing Scheme (EDQM - PTS):** EDQM 2012/ PTS 134 HCV-NAT.

La figura 21 muestra parte del documento correspondiente al protocolo de estudio del último estudio de control de calidad externo realizado, en el cual se evaluó la técnica de **Nested-PCR/VHC** (EDQM, PTS 134, año 2012).

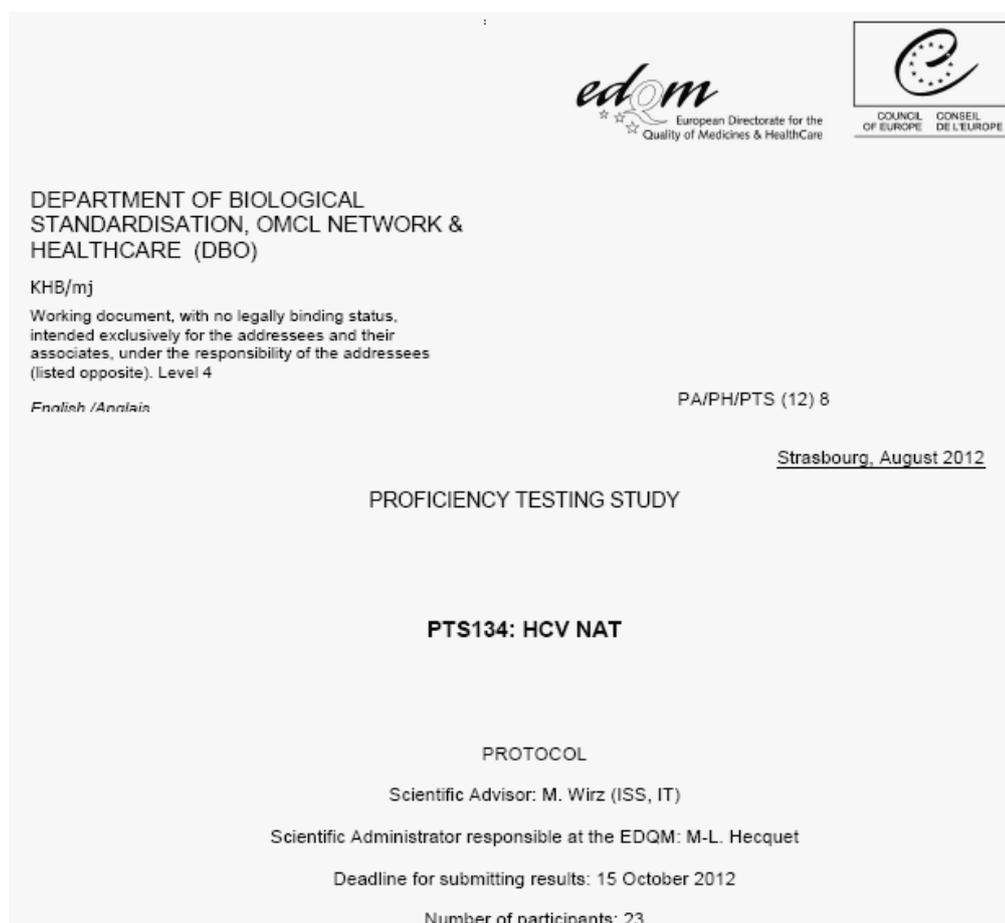


Figura 21. Carátula del protocolo de estudio correspondiente al estudio de control de calidad externo PTS 134 HCV NAT 2012, EQDM.

La tabla 8 resume los resultados obtenidos por los distintos laboratorios participantes en el estudio PTS 134.

Tabla 8. Informe de resultados emitidos por el Departamento de Estandarización Biológica (PTS) correspondiente al estudio de control de calidad externo PTS 134 HCV NAT 2012, EQDM. En el mismo se pueden apreciar los resultados obtenidos por el Laboratorio de Hemoderivados mediante Nested-PCR/VHC (código del laboratorio n° 2, señalado por punta de flecha).

Genotype		1a+b		2b			3a		NEG		
Nominal conc. (IU/mL)		100	50	1000	100	50	100	50	0	0	0
Sample code		3	6	1	4	8	10	7	2	5	9
Laboratories	1	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	2	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	3	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	4	P	P	P	[P]	P	P	P	N	N	N
	5	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	6a	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	6b	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	7	P	N	P	P	P	P	P	N	N	N
	8	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	9	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	10	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	11	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	12	P	P	P	P	P	P	N	N	N	N
	13	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	14	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	15	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	16	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	17	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
	18	P	P	P	N	P	P	P	N	Inv.	N
	19	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N
20	P	P	P	P	P	P	P	N	N	N	
Total number of tests		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Percentage positive*		100%	95%	100%	95% 90%	100%	100%	95%	5%	5%	0%

Explanations:

P="positive result" and N="negative result". Inv.=invalid test.

Results in the "grey zone" are indicated between brackets as [P].

Inconclusive results are printed on a grey background. See text for details.

Black cells indicate tests where a negative result was found but a positive result was required, or vice versa.

*In the case of doubtful or inconclusive results, a "best case" and a "worst case" percentage of positive results is given.

Mediante este estudio, se pudo detectar el 100% de las muestras con ARN/VHC de todos los genotipos, especialmente aquellas de baja concentración viral (50 UI/ml). Además, se demostró la ausencia de contaminación cruzada en base a la no reactividad de todas las muestras negativas analizadas.

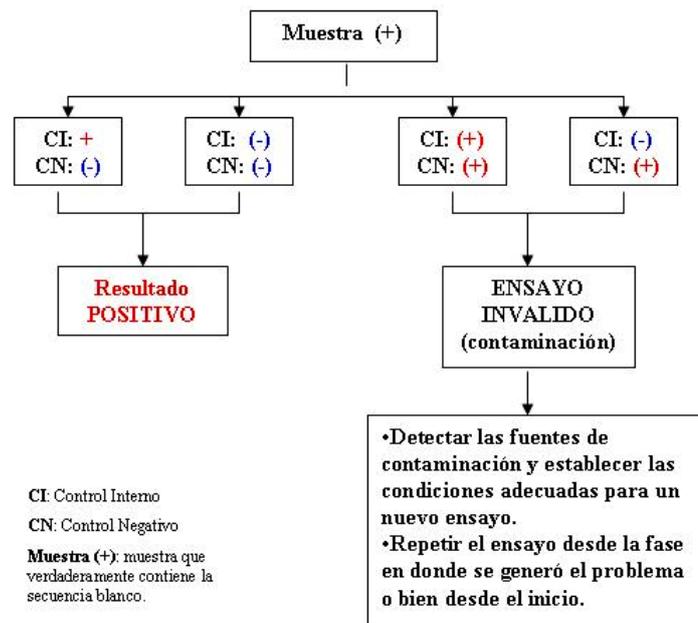
Según PTS 134 HCV NAT, la técnica empleada por el LHD (Nested-PCR/VHC) posee los atributos analíticos (límite de detección, especificidad y robustez) necesarios para cumplir con los requisitos internacionales de calidad.

IV- Algoritmo de trabajo para el manejo de resultados obtenidos por PCR

La incorporación de los controles necesarios en cada ensayo de PCR puede generar una gama de posibles resultados, por lo que es necesario unificar el criterio de análisis y protocolizarlo para garantizar una adecuada interpretación (ver cap. **IIIb, punto 6: Interpretación de los resultados**). En relación a ello, se ha desarrollado un algoritmo de trabajo que permite instruir al analista de cómo proceder ante la obtención de un resultado esperado o no esperado, aplicado a cualquier técnica descrita en este trabajo.

En la figura 22 (A y B) se resume el algoritmo de trabajo propuesto para el manejo de resultados obtenidos por PCR.

A



B

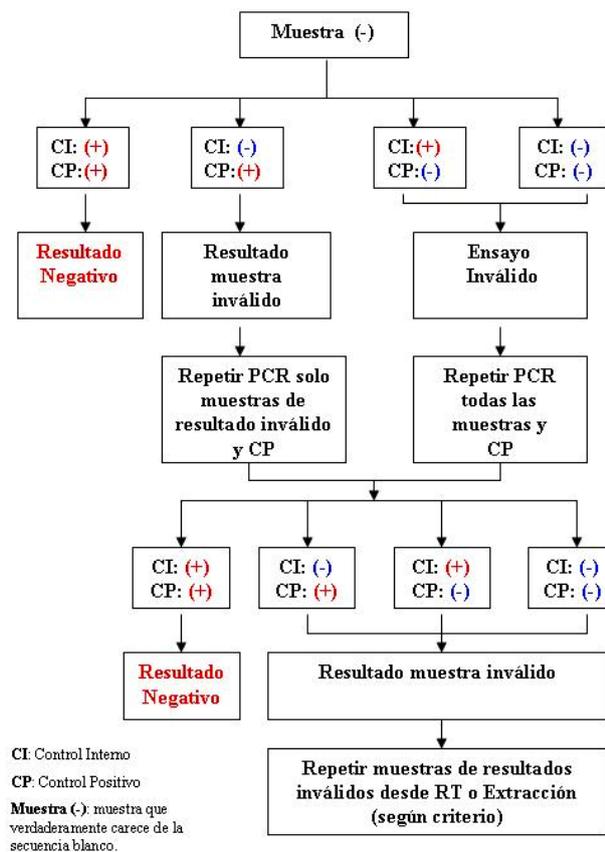


Figura 22. Algoritmo propuesto por el autor de este trabajo para el manejo de un resultado positivo (A) ó un resultado negativo (B) obtenido para muestra problema mediante RT-Nested-PCR.

Es necesario recordar que debido a la alta sensibilidad analítica y al bajo límite de detección de la técnica de PCR y por consiguiente, al inherente riesgo de contaminación cruzada, es necesario confirmar un resultado positivo repitiendo el análisis de la muestra por duplicado desde una nueva alícuota. La muestra es considerada positiva si al menos uno de los dos duplicados arroja un resultado positivo (EDQM 2012).

V- Armonización de las técnicas de PCR en el Laboratorio de Hemoderivados

Con el propósito de adecuar la ejecución de las técnicas descritas en el presente trabajo, se diseñaron protocolos operativos que han permitido optimizar el empleo de los recursos del LHD, en relación al análisis de los principales marcadores

virales: VHB, B19, VHC y VIH-1. La estrategia fue la de purificar el ácido nucleico de todos los virus en un único tubo mediante la técnica comercial descrita (Qiagen), minimizando el costo de realizar cuatro extracciones por separado (cuatro marcadores virales).

Se analizó una solución de trabajo provisto por NIBSC que contiene cinco marcadores virales en distintas concentraciones (ver Fig. 23): VIH-1, VHC, B19, VHB y VHA (Working Standard Multiplex Working Reagent for Nucleic Acid Amplification Techniques NIBSC code: 99/732). Los ácidos nucleicos de los cinco virus, así como también del ARN/CI, fueron co-purificados en un mismo tubo. Posteriormente, se prosiguió con las técnicas de amplificación correspondientes a cada grupo viral (PCR/VHA aún no ha sido desarrollada). **PCR/VHB** y **PCR/B19** constituyen técnicas de amplificación individuales y cuentan con un único CI (ADN genómico humano), mientras que *multiplex Nested-PCR /VHC+VIH-1* permite la detección simultánea de ambos virus ARN.

En la figura 23 se muestran los resultados de uno de los ensayos realizados en la que se observan los productos de amplificación obtenidos de las distintas técnicas empleadas en el LHD. Si bien, el origen de los productos de amplificación corresponde a reacciones separadas, se han sembrado en un mismo gel de agarosa para poder dimensionar el diseño experimental.

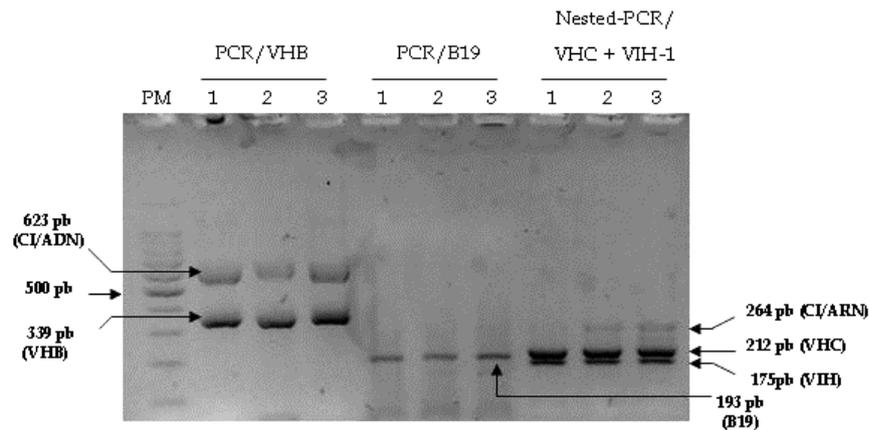


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 2,3% de los productos de amplificación (*) obtenidos de todas las técnicas de PCR aplicadas en el LHD: PCR/VHB, PCR/B19 y *múltiplex* Nested-PCR/VHC+VIH-1. **Líneas 1 y 2:** 1 ml de reactivo 99/732 sin diluir (**). **Línea 3:** 1 ml de reactivo 99/732 diluido 1/2, centrifugado a 18.000 rpm (4° C) por 45 minutos. **PM:** marcador de tamaño molecular.

*Los tamaños de los productos de amplificación son: 339 pb (VHB); 193 pb (B19); 623 pb (CI/ADN); 212 pb (VHC); 175 pb (VIH-1); 264 pb (CI/ARN).

**La solución de trabajo 99/732 sin diluir provista por NIBSC contiene: 1.000 UI/ml de VHB (genotipo adw); 1.000 UI/ml de B19, 2.000 genomas equivalentes/ml de VHA; 710 UL/ml de VHC (gt 3) y 3.630 UI/ml de VIH-1.

DISCUSIÓN

Los HD son medicamentos que deben otorgar un beneficio terapéutico y ser biológicamente seguros para los pacientes. La seguridad en la producción de los mismos depende de factores ligados, tanto a la selección de la materia prima (plasma), como al cumplimiento de las buenas prácticas de manufactura del proceso productivo. La calidad del plasma depende fundamentalmente de los procedimientos aplicados en los bancos de sangre. En relación a ello, el control serológico inicial en las donaciones de sangre para los principales marcadores virales mediante las técnicas de última generación ha permitido minimizar la probabilidad de que una unidad de sangre de un donante infectado sea transfundida a un paciente receptor, o bien sea empleada como materia prima en la producción de un HD. Aún así, existe una limitación técnica ligada a problemas de sensibilidad diagnóstica, especialmente en los días próximos posteriores a la infección del donante, en el cual no es posible la detección de los anticuerpos y/o antígenos virales.

La detección directa de los ácidos nucleicos virales mediante NAT ha demostrado ser una herramienta poderosa aplicada al tamizaje de las donaciones de sangre así como también a las mezclas de plasma destinadas a la producción de HD. Mediante la misma es posible acortar significativamente el período de ventana serológica generado por las técnicas serológicas tradicionales y por ende, disminuir el riesgo biológico, brindando mayor seguridad en los HD. Sin embargo, la aplicación de NAT en centros de transfusión, bancos de sangre e industrias fraccionadoras del plasma, se ha visto obstaculizada debido a una serie de dificultades (Romero 2008). Una de ellas está asociada a cuestiones de índole económica ya que la mayoría de los métodos comerciales disponibles han resultado ser inaccesibles para algunos bancos de sangre de baja complejidad y recursos (ej: bajo número de donantes). Otra de ellas se enmarca en la difícil aplicabilidad de estos métodos comerciales a la industria farmacéutica de los HD ya que los mismos están validados (ej: detección cualitativa del ARN/VHC) para muestras individuales o pequeños *pools* (ej: 6 unidades) (Coste, Reesink et al. 2005), por lo que parámetros analíticos como límite de detección, especificidad y robustez no pueden considerarse válidos cuando se analizan grandes mezclas de plasma.

Consecuentemente, algunas industrias farmacéuticas han decidido desarrollar sus propios métodos de NAT y adecuarlos a los requerimientos de calidad establecidos por las instituciones de control. La decisión de cada laboratorio acerca de la incorporación de NAT, ya sea comercial o *in-house*, seguramente depende del criterio y políticas adoptados, de las exigencias legales, de las circunstancias epidemiológicas regionales y de las posibilidades con las que cuenta (Busch and Dodd 2000).

La aplicación de las técnicas *in-house* trae asociado una serie de inconvenientes técnicos, entre los cuales pueden citarse aquellos relacionados a resultados falsos positivos, falsos negativos, baja especificidad, límite de detección no aceptable, falta de automatización, requerimientos especiales de infraestructura y capacitación de los analistas, entre otras.

Para estandarizar y validar las técnicas *in-house* es necesario adquirir los estándares de referencia internacionales que permitan cumplir con las normas de control de calidad. Acorde a ello, una de las características particulares y distintivas que deben tener las técnicas a ser incorporadas en la industria de los HD es que el **límite de detección** debe ser menor respecto de las técnicas aplicadas en bancos de sangre. Esta aseveración se fundamenta en el hecho de que una potencial unidad contaminante con carga viral elevada estaría sometida a un proceso de dilución considerable en una gran mezcla de plasma, que en algunos casos podría no ser detectable. La **robustez** también es un parámetro a ser considerado cuando se validan técnicas en grandes mezclas de plasma ya que la muestra resulta ser más compleja y heterogénea. La **especificidad** también es afectada cuando se trabaja con grandes mezclas de plasma ya que el perfil de microorganismos es más variado, el que incluye exposición de cada donante a distintos virus, bacterias, hongos, etc. En este sentido, la especificidad de los oligonucleótidos empleados en PCR debe ser demostrada en estas matrices (grandes mezclas de plasma) para comprobar que no hibriden con secuencias no relacionadas al genoma del virus a identificar.

Muchos de los métodos *in-house* han sido generados sin considerar la presencia de un CI, reactivo esencial que permite garantizar la calidad de los resultados mediante la detección de falsos negativos y la confirmación de los

verdaderos negativos. Una de las estrategias que adoptaron inicialmente algunos laboratorios que no contaban con un CI fue la de realizar ensayos de recuperación, en los cuales las muestras se procesaban por duplicado, con y sin el agregado de una concentración conocida del virus de interés. Mediante estos ensayos era posible detectar aquellos inhibidores que pudiesen existir en la matriz original de la muestra, pero no representaba en absoluto la realidad de aquel tubo en el cual se encuentra analito. Esta estrategia es sin lugar a dudas poco práctica y segura e insume mucho más recursos económicos y humanos.

En el presente trabajo se describe el desarrollo y síntesis de una molécula quimérica de ácido ribonucleico compuesta por una secuencia perteneciente a la región 5' no codificante (5'NC) del genoma del VHC y por otra perteneciente a una secuencia de diseño único, insertada en la anterior.

Se demostró que su incorporación a técnicas de PCR permite la detección e identificación inequívoca, simple y simultánea, del ARN/ VHC y ARN/VIH-1, en *pools* de plasma humano, como así también en una amplia gama de HDs. Los resultados obtenidos también demostraron que las técnicas aplicadas poseen un adecuado límite de detección y reproducibilidad para ambos virus, cubriendo además la detección de los seis principales genotipos del VHC, así como también los genotipos del VIH-1 de mayor importancia epidemiológica regional.

Además se demostró que el CI sintetizado permite controlar las etapas de extracción, purificación, amplificación, detección e identificación de los ácidos nucleicos virales del VHC y VHI-1 en concordancia a lo reportado por otros investigadores (Pasloske, Walkerpeach et al. 1998; Niesters 2001; Hoorfar, Malorny et al. 2004).

El proceso de desarrollo de un CI no es una tarea sencilla, debe contemplar además del **diseño** del mismo, la **optimización** y **validación** de las técnicas en las cuales será aplicado. Para ello, existen parámetros críticos que deben ser respetados para lograr una adecuada eficiencia de amplificación, tanto del CI como de las secuencias virales de interés. Uno de los parámetros a considerar en el **diseño** es el tamaño del CI. Si bien, la eficiencia de amplificación es mayor en aquellos fragmentos más cortos (Sachadyn and Kur 1998) el tamaño del CI debe ser lo más cercano a las

secuencias a analizar (Hoorfar, Malorny et al. 2004). En relación a ello, es preferible que el tamaño del CI sea mayor al de la secuencia de interés para que esta última no pierda eficiencia de amplificación (Brightwell, Pearce et al. 1998). En este sentido, el CI descrito en este trabajo comprende una secuencia de ARN de 310 ribonucleótidos que permite generar, mediante RT-Nested-PCR, un producto de amplificación de 264 pb de ADN. El mismo permite monitorear la amplificación de una secuencia de VHC de 212 pb de ADN, así como también monitorear la amplificación de una secuencia de VIH-1 de 175 pb de ADN.

Durante la **optimización** se debe demostrar que el límite de detección de la técnica no sea afectado significativamente por la cantidad de CI presente. La concentración debe ser óptima para lograr su eficiente amplificación, sin afectar la eficiencia de amplificación de la secuencia a analizar. Aquellos CIs que son competitivos emplean el mismo juego de oligonucleótidos iniciadores que los genomas virales de interés, por lo que la eficiencia de amplificación de las secuencias virales está especialmente influenciada por la cantidad de CI adicionada a la muestra (Hoorfar, Malorny et al. 2004). Si bien, los CIs no competitivos no comparten los mismos oligonucleótidos, existe competencia por los demás reactivos (polimerasa, cloruro de magnesio, dNTP's, etc). El CI competitivo posee mayores ventajas debido a que refleja con mayor certeza las condiciones de amplificación. Sin embargo, la optimización de las técnicas requiere de especial cuidado, a consecuencia de las diferentes eficiencias de amplificación de las secuencias que compiten. El CI no competitivo tiene la ventaja de ser más versátil en su aplicación ya que es posible emplearlo para una amplia gama de virus relacionados en su naturaleza (ARN, ADN). A pesar de ello, al necesitar más de un juego de oligonucleótidos iniciadores, la reacción se convierte en una *multiplex*-PCR, por lo que también resulta tediosa su optimización.

El CI del presente trabajo ha sido diseñado para que actúe en forma competitiva con una secuencia del ARN/VHC y de manera no competitiva con una secuencia del ARN/VIH-1. La concentración de trabajo del mismo ha sido optimizada con rigurosidad para garantizar la detección de 100 UI/ml de ARN/VHC, cumpliendo con las normativas internacionales y nacionales vigentes. Además, se ha

adaptado esa misma concentración de trabajo para permitir la detección del ARN/VIH-1, de manera de aportar practicidad y aprovechamiento de recursos en la ejecución de las técnicas, evitando la segregación de las mismas en procesos de extracción de ácidos nucleicos separados.

La **validación** de la técnica en la que el CI es aplicado es la etapa subsecuente que otorga confiabilidad analítica. Las técnicas descritas han sido validadas mediante el empleo de estándares internacionales certificados y mediante la participación en estudios de control de calidad internacionales, demostrándose especificidad, robustez y un adecuado límite de detección (52,7 UI/ml y 164,2 UI/ml, para VHC y VIH-1, respectivamente).

Durante la **implementación** de la técnica en la que se incorpora el CI se evalúa principalmente la reproducibilidad de la misma en las diversas matrices a analizar. Las técnicas presentadas en el trabajo se aplican tanto a plasma como HD. En este sentido, es importante destacar que se ha adaptado y validado el método comercial de purificación de ácidos nucleicos (Qiagen) para matrices que no son plasmáticas (la plataforma comercial citada no ofrece esa posibilidad). Cabe señalar que el uso del CI desarrollado se aplica actualmente a otros HD no mencionados en el trabajo, como Gammaglobulina T UNC (GT), Gammaglobulina Anti-Rho (GR), factor VIII (FVIII) y semielaborados (criosobrenadante, fracción V, fracción II, fracción II+III) (resultados no mostrados).

Adicionalmente, se ha demostrado la factibilidad de ensamblar las técnicas en las cuales se ha incluido el CI con aquellas destinadas al análisis por PCR de otros virus (ADN) en el LHD, permitiendo optimizar aún más el recurso económico y humano, ya que es posible emplear solo un tubo de extracción de ácidos nucleicos para cuatro marcadores virales, sumados al ARN/CI.

La falta de estandarización de las técnicas de biología molecular, especialmente PCR, para la detección de microorganismos presentes en sangre, es actualmente un problema de magnitud considerable. Diversos factores son los responsables, entre los cuales podemos citar el empleo de distintos tipos de polimerasas, diferentes plataformas comerciales, capacitación de analistas, así como también diferentes CIs, entre otros.

La ausencia de CIs en muchas técnicas disponibles de biología molecular es sin duda uno de los mayores problemas, por lo que constituye uno de los mayores desafíos en la actualidad. Algunos laboratorios han logrado desarrollar sus propios CIs para aplicarlos en la detección de una amplia variedad de especímenes de origen microbiológico. A modo de ejemplo, Rosenstraus y col. desarrollaron un CI empleado en PCR para el diagnóstico de especímenes clínicos en la rutina, especialmente para la detección de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis* y VHC (Rosenstraus, Wang et al. 1998). Castelain y col. desarrollaron un CI para la cuantificación del ARN/VHC con un método de RT-PCR con sondas TaqMan (PCR en tiempo real con sondas fluorescentes) (Castelain, Descamps et al. 2004), basado en una cadena del virus de la diarrea bovina no citopático inactivado. Debido a la escasez de métodos comerciales disponibles para muchos virus de interés clínico, Niesters y col. desarrollaron un CI viral universal consistente en un herpes virus completo no humano (ADN) que permite monitorear los procesos de purificación y amplificación de los ácidos nucleicos (Niesters 2004). Villanova y col. han descrito una estrategia para producir un CI competitivo estable, basado en una molécula recombinante derivada de un fago para la detección del ARN/VHC (Villanova, Gardiol et al. 2007). Pasloske y col. describen una tecnología que permite sintetizar estándares y controles externos virales ARN (VIH-1, VHC) resistentes a la acción de las ribonucleasas, que si bien no demuestran que puede ser usada para generar CIs, es una estrategia interesante para otorgar más resistencia a los CIs ya desarrollados (Pasloske, Walkerpeach et al. 1998).

Existe controversia a nivel mundial en cuanto a si se debe exigir o no el empleo de CI para técnicas de biología molecular, tanto para diagnóstico como para investigación. Hoorfar y col. están a favor de considerar la alternativa como una exigencia de calidad, fundamentalmente en el área de microbiología, en la cual se observa una gran proporción de resultados falsos negativos por la presencia de inhibidores de la PCR (Hoorfar, Cook et al. 2003). Las razones encontradas para la negativa reside en el elevado costo adicional que implica implementar dichas metodologías (Hoorfar, Malorny et al. 2004). Muchos especialistas advierten que una colaboración internacional entre laboratorios para establecer un CI universal para

virus ARN representaría un avance importante en la estandarización de las técnicas de virología molecular (Niesters 2004), por lo que el desarrollo de CIs competitivos constituye el mayor desafío. Una idea propuesta a futuro sería la factibilidad de diseñar un CI de tipo universal conformado por una molécula recombinante compuesta por tantas secuencias específicas como familias de virus se desee analizar para usarlos en ensayos simples o múltiples.

Afortunadamente se ha progresado de manera sorprendente en el campo de la biología molecular aplicada a la virología; diversas técnicas de amplificación genómica han sido desarrolladas y mejoradas, especialmente para el tamizaje en bancos de sangre para la detección simultánea de los principales marcadores virales de origen sanguíneo (Tabor and Epstein 2002; Eiras, Franco et al. 2003; Eiras, Sauleda et al. 2003; Coste, Reesink et al. 2005; Romero 2008). La automatización llegó con los métodos comerciales y la demanda para el tamizaje en bancos de sangre permitió una mayor accesibilidad a ellos. La posibilidad de amplificar varias secuencias distintas en un solo tubo de reacción ha sido demostrada por varias tecnologías comerciales que son empleadas actualmente. Estos ensayos denominados múltiples o *multiplex* permiten detectar varios virus simultáneamente, lo que confiere una gran ventaja en el tamizaje en bancos de sangre y centros de transfusión. Mediante este trabajo se ha demostrado que la incorporación del CI a una técnica *in-house* para la detección simultánea del ARN/VHC y ARN/VIH-1 en plasma y HD, permite optimizar el recurso técnico de manera relevante, evitando el análisis individual para cada virus. En este sentido, se ofrece un marco abierto de posibilidades para incorporar el CI a técnicas de PCR destinadas a la detección de otros virus tipo ARN, como VHA, hecho que podría concretarse en un futuro cercano.

La molécula sintética de ARN desarrollada en la presente tesis puede ser usada como un producto único o formar parte de un *kit* de reacción de PCR para la detección de los virus mencionados, en muestras de origen biológico como plasma y HD. El CI desarrollado con tecnología simple de biología molecular puede resolver en gran parte los problemas y limitaciones asociados a la implementación de NAT, tanto en la industria farmacéutica productora de HD, como en bancos de sangre y laboratorios de análisis clínicos, especialmente en aquellos de baja complejidad. Las

técnicas en las cuales el CI ha sido incluido, constituyen una opción alternativa a los métodos comerciales disponibles para la detección del ARN/VHC y ARN/VIH-1.

El impacto económico es relevante debido al bajo costo y escasa complejidad requeridos, tanto para la síntesis como almacenamiento del CI. La calidad de la molécula sintética, la adaptación a técnicas de PCR de detección simple y simultánea, la versatilidad de implementación en diversas matrices biológicas y los considerables beneficios económicos que se deducen, permiten disponer de un reactivo esencial para asegurar la calidad de un resultado obtenido por PCR.

Los resultados de este trabajo de Tesis forman parte de una patente nacional en trámite (INPI: Exp N° 20110104791).

ANEXO

ANEXO

SECUENCIAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES EMPLEADOS EN LA CONSTRUCCIÓN DEL CI Y EN LAS REACCIONES DE RT-NESTED PCR *IN-HOUSE*.

Nombre	Secuencia (5´- 3´)	Polaridad	Especificidad	Referencias
p1	TGCACGGTCTACGAGACCTC	-	VHC/CI	(Novati, Thiers et al. 1992)
p2	GCCATGGCGTTAGTATGAGT	+	VHC/CI	(Novati, Thiers et al. 1992)
p3	GTGCAGCCTCCAGGACCCCC	+	VHC/CI	(Novati, Thiers et al. 1992)
p4	GGGCACTCGCAAGCACCTAT	-	VHC/CI	(Novati, Thiers et al. 1992)
p5	TACTGCCCCCTTCACCTTTCCA	-	VIH-1	(Fransen, Zhong et al. 1994)
p6	CCCTACAATCCCCAAAGTCAAG G	+	VIH-1	(Fransen, Zhong et al. 1994)
p7	TAAGACAGCAGTACAAATGGC AG	+	VIH-1	(Fransen, Zhong et al. 1994)
p8	GCTGTCCCTGTAATAAACCCG	-	VIH-1	(Fransen, Zhong et al. 1994)

PROTOCOLOS DE REACCIÓN

RT #1: reacción de transcripción reversa 1

Mezcla de reacción: 10 µl ARN purificado; 4 µM de oligonucleótido **p1**, 200 U de Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV), Promega; 1 mM de cada dNTPs, buffer de reacción 5X (Promega), en un volumen final de reacción de 19 µl.

Reacción: La hibridación de p1 con el ARN fue realizada a 65 °C por 15 minutos y la reacción enzimática de RT se realizó a 37 °C por 90 minutos. Finalmente, la reacción se inactivó a 95 °C por 3 minutos.

PCR #1: reacción en cadena de la polimerasa 1

Mezcla de reacción: 5 μ l del ADNc molde; 0,8 μ M de oligonucleótido **p2**; 1,6 mM de $MgCl_2$; 0,13 mM dNTPs; 0,8 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de reacción 10X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 25 μ l.

Reacción: La amplificación fue realizada en termociclador Bio-rad, My Cycler Thermal Cycler versión 1.065 bajo las siguientes condiciones de ciclado (**ciclado 1**): un paso de desnaturalización inicial de 95° C por 90 segundos y posteriormente, 35 ciclos de: desnaturalización del templado (94 °C por 25 seg.), hibridación del oligonucleótido iniciador (55 °C por 25 seg.), y extensión del oligonucleótido (72 °C por 25 seg.).

PCR #2: reacción en cadena de la polimerasa 2

Mezcla de reacción: 5 μ l del producto de PCR; 0,8 μ M de oligonucleótido **p1**; 0,8 μ M de oligonucleótido **p2**; 1,6 mM de $MgCl_2$; 0,13 mM dNTPs; 0,8 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de reacción 10X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 25 μ l.

Reacción: La amplificación se realizó en termociclador Bio-rad, My Cycler Thermal Cycler versión 1.065 bajo las condiciones de **ciclado 1**.

PCR #3: reacción en cadena de la polimerasa 3

Mezcla de reacción: 5 μ l del producto de PCR; 0,36 μ M de oligonucleótido **p3**; 0,36 μ M de oligonucleótido **p4**; 1,8 mM de $MgCl_2$; 0,14 mM dNTP's; 1,8 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de reacción 10X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 50 μ l.

Reacción: La amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones de ciclado (**ciclado 2**): un paso de desnaturalización inicial de 95 °C por 90 segundos y posteriormente, 35 ciclos de: desnaturalización del templado (94 °C por 15 seg.), hibridación de oligonucleótidos iniciadores (63 °C por 15 seg.), y extensión del oligonucleótido (72 °C por 15 seg.).

RT #2: reacción de transcripción reversa 2

Mezcla de reacción: 20 μ l ARN purificado; 1,56 μ M del oligonucleótido **p1** (CI); 1,56 μ M del oligonucleótido **p5** (VIH-1); 200 U de M-MLV, 1 mM de cada d'NTP, buffer de reacción 5X (Promega), en un volumen final de reacción de 32 μ l.

Reacción: La hibridación de los oligonucleótidos con el ARN se realizó a 65 °C por 15 minutos y la reacción enzimática de RT se realizó a 37 °C por 90 minutos. Finalmente, la reacción se inactivó a 95 °C por 3 minutos.

PCR #4: reacción en cadena de la polimerasa 4

Mezcla de reacción: 5 µl de ADNc molde; 0,1 µM del oligonucleótido **p2** (CI); 0,08 µM del oligonucleótido **p6** (VIH-1); 5 mM de MgCl₂; 0,6 mM dNTP's; 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de reacción 10X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 50 µl.

Reacción: La amplificación fue realizada en termociclador Bio-rad, My Cycler Thermal Cycler versión 1.065 bajo las siguientes condiciones de ciclado (**ciclado 3**): un paso de desnaturalización inicial de 94°C por 2 minutos y posteriormente, 35 ciclos de: desnaturalización del templado (94 °C por 30 seg.), hibridación de oligonucleótidos iniciadores (61 °C por 30 seg.), y extensión de oligonucleótidos (72 °C por 30 seg.). Finalmente, se realizó un paso de extensión final a 72 °C por 2 minutos.

PCR #5: reacción en cadena de la polimerasa 5

Mezcla de reacción: 5 µl del producto de PCR; 0,1 µM de cada uno de los oligonucleótidos **p3** y **p4** (CI); 0,08 µM del oligonucleótido **p7** (VIH-1); 0,08 µM del oligonucleótido **p8** (VIH-1); 4 mM de MgCl₂; 0,6 mM dNTP's; 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de reacción 10X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 50 µl.

Reacción: La amplificación fue realizada bajo las siguientes condiciones de ciclado (**ciclado 4**): un paso de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos y posteriormente, 35 ciclos de: desnaturalización del templado (94 °C por 30 seg.),

hibridación de oligonucleótidos iniciadores (65 °C por 30 seg.), y extensión de oligonucleótidos (72 °C por 30 seg.). Finalmente, se realizó un paso de extensión final a 72°C por 2 minutos.

PCR #6: reacción en cadena de la polimerasa 6

Mezcla de reacción: 5 µl de ADNc molde; 0,37 µM del oligonucleótido **p2** (CI + VHC); 0,12 µM del oligonucleótido **p6** (VIH-1); 5 mM de MgCl₂; 0,6 mM dNTPs; 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de reacción 10X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 50 µl.

Reacción: La amplificación se realizó en termociclador Bio-rad, My Cyclyer Thermal Cyclyer versión 1.065 bajo las condiciones de **ciclado 3**.

PCR #7: reacción en cadena de la polimerasa 7

Mezcla de reacción: 5 µl del producto de PCR; 0,37 µM de de cada uno de los oligonucleótidos **p3** y **p4** (CI + VHC); 0,12 µM de cada uno de los oligonucleótidos **p7** y **p8** (VIH-1); 4 mM de MgCl₂; 0,6 mM dNTPs; 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de reacción 10X (Invitrogen), en un volumen final de reacción de 50 µl.

Reacción: La amplificación se realizó en termociclador Bio-rad, My Cyclyer Thermal Cyclyer versión 1.065 bajo las condiciones de **ciclado 4**.

MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Luria Bertani (LB)	
Triptona	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	csp 500 ml

Preparación de células competentes

Se cultivó la cepa *E. coli* DH5 α en 5 ml de medio LB a 37°C durante toda una noche en un incubador con agitación orbital (cultivo iniciador). Posteriormente, se inocularon 500 ml de medio de cultivo LB con los 5 ml del cultivo iniciador y se incubaron hasta alcanzar una $DO_{\lambda=600} = 0,5-0,6$. Posteriormente se centrifugó el cultivo por 10 min a 3000 g a 4 °C y se resuspendió el pellet celular en 50 ml de solución de almacenamiento para transformación (su composición se detalla abajo). A la solución resultante se le agregó glicerol a concentración final 10%, se alicuotó en viales de 50 μ l y se congeló en N₂ líquido. Las alícuotas se conservaron a -80°C hasta su utilización.

Solución de almacenamiento para Transformación

Solución		Conc. inicial	Cantidad (ml)	Conc. final
Medio	LB,	2x	20,5	1x
	pH 6,5			
PEG	PM	50%	10	10%
	3350			
DMSO*		100%	2,5	5%
MgCl ₂		1 M	0,5	10 mM
MgSO ₄		1 M	0,5	10 mM
Agua			c.s.p. 50	
	destilada			

*Dimetilsulfóxido

Se esterilizó el medio LB por autoclavado y luego se agregaron los demás compuestos previamente esterilizados por filtración con membranas de 0,22 μm .

Transformación de células competentes

Se incubaron las bacterias competentes durante 10 min en hielo. Se preparó la mezcla de DNA de la siguiente manera: 10 μl de DNA plasmídico, 10 μl de solución KCM 5X (ver abajo) y 30 μl de agua destilada milliQ. Se incubó la mezcla durante 10 min en hielo. Se mezcló el DNA con 50 μl de bacterias competentes y se incubaron 20 min en hielo, seguidos de 10 min a temperatura ambiente. Se agregó 1 ml de LB y se incubó 1 h a 37 °C con agitación. Finalmente, se plaqueó 100 μl sobre medio LB sólido conteniendo ampicilina (concentración final 100 $\mu\text{g/ml}$).

Solución de almacenamiento para Transformación

Solución	Conc. inicial	Cantidad (ml)	Conc. final
KCl	1 M	25	0,5 M
CaCl ₂	1 M	7,5	0,15 M
MgCl ₂	1 M	12,5	0,25 M
Agua destilada		c.s.p. 50	

La solución fue esterilizada en autoclave y se conservó ya alicuotada a -20 °C.

BIBLIOGRAFÍA

- Aberham, C., C. Pendl, et al. (2001). "A quantitative, internally controlled real-time PCR Assay for the detection of parvovirus B19 DNA." *J Virol Methods* 92(2): 183-91.
- Allain, J. P., S. L. Stramer, et al. (2009). "Transfusion-transmitted infectious diseases." *Biologicals* 37(2): 71-7.
- Beld, M., R. Minnaar, et al. (2004). "Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control." *J Clin Microbiol* 42(7): 3059-64.
- Blanchette, V. S., E. Vorstman, et al. (1991). "Hepatitis C infection in children with hemophilia A and B." *Blood* 78(2): 285-9.
- Bremard-Oury, C., P. Aucouturier, et al. (1986). "Immunoglobulin G subclasses in patients with immunodeficiencies." *Monogr Allergy* 20: 75-9.
- Bresee, J. S., E. E. Mast, et al. (1996). "Hepatitis C virus infection associated with administration of intravenous immune globulin. A cohort study." *JAMA* 276(19): 1563-7.
- Brightwell, G., M. Pearce, et al. (1998). "Development of internal controls for PCR detection of *Bacillus anthracis*." *Mol Cell Probes* 12(6): 367-77.
- Brooker, M. (2012). "Registry of Clotting Factor Concentrates , World Federation of Hemophilia (WWW document. URL www.wfh.org) " ninth edition, 2012.
- Buchacher, A. and G. Iberer (2006). "Purification of intravenous immunoglobulin G from human plasma--aspects of yield and virus safety." *Biotechnol J* 1(2): 148-63.
- Bukh, J., R. H. Purcell, et al. (1992). "Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(11): 4942-6.
- Bukh, J., R. H. Purcell, et al. (1994). "Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 8239-43.
- Burnouf, T. (1995). "Chromatography in plasma fractionation: benefits and future trends." *J Chromatogr B Biomed Appl* 664(1): 3-15.
- Busch (2010). Workshop on Surveillance and Screening of Blood Born Pathogens. Zabreg, Croatia.
- Busch, M. P. (2000). "HIV, HBV and HCV: new developments related to transfusion safety." *Vox Sang* 78 Suppl 2: 253-6.
- Busch, M. P. and R. Y. Dodd (2000). "NAT and blood safety: what is the paradigm?" *Transfusion* 40(10): 1157-60.
- Busch, M. P., S. H. Kleinman, et al. (2000). "Committee report. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases: Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors." *Transfusion* 40(2): 143-59.
- Candotti, D., A. Richetin, et al. (2003). "Evaluation of a transcription-mediated amplification-based HCV and HIV-1 RNA duplex assay for screening individual blood donations: a comparison with a minipool testing system." *Transfusion* 43(2): 215-25.
- Cardoso, M. S., K. Koerner, et al. (1999). "Experiences in HCV-NAT screening prior to releasing cellular components by the German Red Cross Blood Transfusion Service of Baden-Wurtemberg." *Biologicals* 27(4): 281-4.
- Carrozzo, M., R. Quadri, et al. (2002). "Molecular evidence that the hepatitis C virus replicates in the oral mucosa." *J Hepatol* 37(3): 364-9.

- Castelain, S., V. Descamps, et al. (2004). "TaqMan amplification system with an internal positive control for HCV RNA quantitation." J Clin Virol 31(3): 227-34.
- Clancy, A., B. Crowley, et al. (2008). "The development of a qualitative real-time RT-PCR assay for the detection of hepatitis C virus." Eur J Clin Microbiol Infect Dis 27(12): 1177-82.
- Cleland, A., P. Nettleton, et al. (1999). "Use of bovine viral diarrhoea virus as an internal control for amplification of hepatitis C virus." Vox Sang 76(3): 170-4.
- Cohn, E. J. (1946). "Blood and blood derivatives." Annu Rep Board Regents Smithsonian Inst: 413-39.
- Cohn, E. J., J. L. Oncley, et al. (1944). "Chemical, Clinical, and Immunological Studies on the Products of Human Plasma Fractionation. I. The Characterization of the Protein Fractions of Human Plasma." J Clin Invest 23(4): 417-32.
- Cohn, E. J., L. E. Strong, et al. (1946). "Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids." J Am Chem Soc 68: 459-75.
- Colombo, M., P. M. Mannucci, et al. (1985). "Transmission of non-A, non-B hepatitis by heat-treated factor VIII concentrate." Lancet 2(8445): 1-4.
- Coste, J., H. W. Reesink, et al. (2005). "Implementation of donor screening for infectious agents transmitted by blood by nucleic acid technology: update to 2003." Vox Sang 88(4): 289-303.
- CPMP, Ed. (1997). Committee for Proprietary Medicinal Products. The introduction of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the detection of hepatitis C virus in plasma pool (CPMP/BWP/390/97). Addendum to note for guidance on plasma derived medicinal products (CPMP/BWP/269/95). CPMP, London.
- Crovatto, M., G. Pozzato, et al. (2000). "Peripheral blood neutrophils from hepatitis C virus-infected patients are replication sites of the virus." Haematologica 85(4): 356-61.
- Choo, Q. L., K. H. Richman, et al. (1991). "Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus." Proc Natl Acad Sci U S A 88(6): 2451-5.
- Delwart, E. L., N. D. Kalmin, et al. (2004). "First report of human immunodeficiency virus transmission via an RNA-screened blood donation." Vox Sang 86(3): 171-7.
- Dietrich, S. L. (1990). "The epidemiology of HIV infection in hemophiliacs." Prog Clin Biol Res 324: 79-86.
- Dietrich, S. L., J. W. Mosley, et al. (1990). "Transmission of human immunodeficiency virus type 1 by dry-heated clotting factor concentrates. Transfusion Safety Study Group." Vox Sang 59(3): 129-35.
- Dingle, K. E., D. Crook, et al. (2004). "Stable and noncompetitive RNA internal control for routine clinical diagnostic reverse transcription-PCR." J Clin Microbiol 42(3): 1003-11.
- Domati-Saad, R. and R. H. Scheuermann (2006). "Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping." Clin Chim Acta 363(1-2): 197-205.
- Dreier, J., M. Stormer, et al. (2005). "Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays." J Clin Microbiol 43(9): 4551-7.

- Drosten, C., E. Seifried, et al. (2001). "TaqMan 5'-nuclease human immunodeficiency virus type 1 PCR assay with phage-packaged competitive internal control for high-throughput blood donor screening." J Clin Microbiol 39(12): 4302-8.
- EAEMP (1997). "European Agency for Evaluation of Medical Products -Committee for Proprietary Medicinal Products Plasma derived medicinal product the introduction of genomic amplification technology (GAT) for the detection of hepatitis C virus RNA in plasma pools. CPMP/BWP/390/97. European Agency for Evaluation of Medical Products, London."
- Echevarria, J. M., P. Leon, et al. (1996). "Laboratory diagnosis and molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis C virus infection among recipients of human intravenous immunoglobulin in Spain." Transfusion 36(8): 725-30.
- EDQM, Ed. (2012). Farmacopea Europea 7ª edición, Técnicas de Amplificación de Ácidos Nucleicos, cap. 2.6.21.
- EDQM, E. P., Ed. (1998). Validation of Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) for the Detection of Hepatitis C Virus (HCV) RNA in Plasma Pools. [EDQM; PA/PH/OMCL (98) 22, DEF].
- Eisler, D. L., A. McNabb, et al. (2004). "Use of an internal positive control in a multiplex reverse transcription-PCR to detect West Nile virus RNA in mosquito pools." J Clin Microbiol 42(2): 841-3.
- Erensoy, S. (2001). "Diagnosis of hepatitis C virus (HCV) infection and laboratory monitoring of its therapy." J Clin Virol 21(3): 271-81.
- Farci, P., H. J. Alter, et al. (1991). "A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis." N Engl J Med 325(2): 98-104.
- Fransen, K., P. Zhong, et al. (1994). "Design and evaluation of new, highly sensitive and specific primers for polymerase chain reaction detection of HIV-1 infected primary lymphocytes." Mol Cell Probes 8(4): 317-22.
- Gallarda, J. L. and E. Dragon (2000). "Blood screening by nucleic acid amplification technology: current issues, future challenges." Mol Diagn 5(1): 11-22.
- Germer, J. J. and N. N. Zein (2001). "Advances in the molecular diagnosis of hepatitis C and their clinical implications." Mayo Clin Proc 76(9): 911-20.
- Gibellini, D., F. Vitone, et al. (2004). "Quantitative detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) viral load by SYBR green real-time RT-PCR technique in HIV-1 seropositive patients." J Virol Methods 115(2): 183-9.
- Hagelberg, E. and J. B. Clegg (1991). "Isolation and characterization of DNA from archaeological bone." Proc Biol Sci 244(1309): 45-50.
- Hagelberg, E., B. Sykes, et al. (1989). "Ancient bone DNA amplified." Nature 342(6249): 485.
- Harris, J. R., Ed. (1990). Blood Separation and plasma fractionation.
- Hernandez, J. M. and J. M. Tusell (1996). "Viral safety of hemoderivatives: in search of zero risk." Sangre (Barc) 41(2): 97-100.
- Hewitt, P. E., C. A. Llewelyn, et al. (2006). "Creutzfeldt-Jakob disease and blood transfusion: results of the UK Transfusion Medicine Epidemiological Review study." Vox Sang 91(3): 221-30.
- Hietala, S. K. and B. M. Crossley (2006). "Armored RNA as virus surrogate in a real-time reverse transcriptase PCR assay proficiency panel." J Clin Microbiol 44(1): 67-70.

- Hnatyszyn, H. J. (2005). "Chronic hepatitis C and genotyping: the clinical significance of determining HCV genotypes." Antivir Ther 10(1): 1-11.
- Hochmeister, M. N., B. Budowle, et al. (1991). "Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains." J Forensic Sci 36(6): 1649-61.
- Holmes, H., C. Davis, et al. (2008). "Development of the 1st International Reference Panel for HIV-1 RNA genotypes for use in nucleic acid-based techniques." J Virol Methods 154(1-2): 86-91.
- Hoorfar, J. and N. Cook (2003). "Critical aspects of standardization of PCR." Methods Mol Biol 216: 51-64.
- Hoorfar, J., N. Cook, et al. (2003). "Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR." J Clin Microbiol 41(12): 5835.
- Hoorfar, J., B. Malorny, et al. (2004). "Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays." J Clin Microbiol 42(5): 1863-8.
- ICH, Ed. (1994). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology ICH Harmonised Tripartite Guideline [Q2(R1)].
- Jackson, B. R., M. P. Busch, et al. (2003). "The cost-effectiveness of NAT for HIV, HCV, and HBV in whole-blood donations." Transfusion 43(6): 721-9.
- James, R. C. and J. W. Mosley (1995). "Hepatitis C virus transmission by intravenous immunoglobulin." Lancet 346(8971): 374; author reply 374-5.
- Kleinman, S., M. P. Busch, et al. (1997). "The incidence/window period model and its use to assess the risk of transfusion-transmitted human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infection." Transfus Med Rev 11(3): 155-72.
- Kleinman, S. H. and M. P. Busch (2000). "The risks of transfusion-transmitted infection: direct estimation and mathematical modelling." Baillieres Best Pract Res Clin Haematol 13(4): 631-49.
- Kleinman, S. H., N. Lelie, et al. (2009). "Infectivity of human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus and risk of transmission by transfusion." Transfusion 49(11): 2454-89.
- Krajden, M. (2000). "Hepatitis C virus diagnosis and testing." Can J Public Health 91 Suppl 1: S34-9, S36-42.
- Kwok, S. and R. Higuchi (1989). "Avoiding false positives with PCR." Nature 339(6221): 237-8.
- Laperche, S., N. Le Marrec, et al. (2003). "A new HCV core antigen assay based on disassociation of immune complexes: an alternative to molecular biology in the diagnosis of early HCV infection." Transfusion 43(7): 958-62.
- Lavanchy, D. (2009). "The global burden of hepatitis C." Liver Int 29 Suppl 1: 74-81.
- Lawlor, E. and G. Columb (1999). "Clinical outcomes after hepatitis C infection from contaminated anti-D immune globulin." N Engl J Med 341(10): 762; author reply 763.
- Le Guillou-Guillemette, H. and F. Lunel-Fabiani (2009). "Detection and quantification of serum or plasma HCV RNA: mini review of commercially available assays." Methods Mol Biol 510: 3-14.
- Lindenbach, B. D. and C. M. Rice (2005). "Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function." Nature 436(7053): 933-8.

- Lombardi, S. (2011). "Trabajo Final de Carrera". Universidad Católica de Sgo. del Estero, Argentina.
- Lush, C. J., C. S. Chapman, et al. (1988). "Transmission of hepatitis B by dry heat treated factor VIII and IX concentrates." Br J Haematol 69(3): 421.
- Llewelyn, C. A., P. E. Hewitt, et al. (2004). "Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion." Lancet 363(9407): 417-21.
- Madej, R. M., J. Davis, et al. (2010). "International standards and reference materials for quantitative molecular infectious disease testing." J Mol Diagn 12(2): 133-43.
- Marey, A., B. Coupez, et al. (1997). "Impact of a quality approach for transfusion safety on prescription, circuit optimization, traceability." Transfus Clin Biol 4(5): 469-84.
- Mariani, G., A. Ghirardini, et al. (1987). "Heated clotting factors and seroconversion for human immunodeficiency virus in three hemophilic patients." Ann Intern Med 107(1): 113.
- MMWR (1982). "Possible transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome (AIDS) - California." MMWR Morb Mortal Wkly Rep 31(48): 652-4.
- Modrow, S., J. J. Wenzel, et al. "Prevalence of nucleic acid sequences specific for human parvoviruses, hepatitis A and hepatitis E viruses in coagulation factor concentrates." Vox Sang 100(4): 351-8.
- Morse, S. S. and A. Schluederberg (1990). "From the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, the Fogarty International Center of the National Institutes of Health, and the Rockefeller University. Emerging viruses: the evolution of viruses and viral diseases." J Infect Dis 162(1): 1-7.
- MSP, Ed. (2006). Pautas VIH SIDA MSP.
- Murphy, D. G., L. Cote, et al. (2000). "Multicenter comparison of Roche COBAS AMPLICOR MONITOR version 1.5, Organon Teknika NucliSens QT with Extractor, and Bayer Quantiplex version 3.0 for quantification of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma." J Clin Microbiol 38(11): 4034-41.
- Niesters, H. G. (2001). "Standardization and quality control in molecular diagnostics." Expert Rev Mol Diagn 1(2): 129-31.
- Niesters, H. G. (2004). "Molecular and diagnostic clinical virology in real time." Clin Microbiol Infect 10(1): 5-11.
- Novati, R., V. Thiers, et al. (1992). "Mother-to-child transmission of hepatitis C virus detected by nested polymerase chain reaction." J Infect Dis 165(4): 720-3.
- Oncley, J. L., M. Melin, et al. (1949). "The separation of the antibodies, isoagglutinins, prothrombin, plasminogen and beta1-lipoprotein into subfractions of human plasma." J Am Chem Soc 71(2): 541-50.
- Operskalski, E. A. and J. W. Mosley (1995). "Pooled plasma derivatives and Creutzfeldt-Jakob disease." Lancet 346(8984): 1224.
- Paabo, S. and A. C. Wilson (1988). "Polymerase chain reaction reveals cloning artefacts." Nature 334(6181): 387-8.
- Palmer, S., A. P. Wiegand, et al. (2003). "New real-time reverse transcriptase-initiated PCR assay with single-copy sensitivity for human

- immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma." J Clin Microbiol 41(10): 4531-6.
- Pasloske, B. L., C. R. Walkerpeach, et al. (1998). "Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards." J Clin Microbiol 36(12): 3590-4.
- Peden, A. H., M. W. Head, et al. (2004). "Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient." Lancet 364(9433): 527-9.
- Peden, A. H. and J. W. Ironside (2004). "Review: pathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease." Folia Neuropathol 42 Suppl A: 85-91.
- Pisani, G., K. Cristiano, et al. (2004). "External quality assessment for the detection of blood-borne viruses in plasma by nucleic acid amplification technology: the first human immunodeficiency virus and hepatitis B virus studies (HIV EQA/1 and HBV EQA/1) and the fifth hepatitis C virus study (HCV EQA/5)." Vox Sang 87(2): 91-5.
- Pisani, G., F. Marino, et al. (2008). "External quality assessment for the detection of HCV RNA, HIV RNA and HBV DNA in plasma by nucleic acid amplification technology: a novel approach." Vox Sang 95(1): 8-12.
- Pistello, M., L. Ceccherini-Nelli, et al. (1991). "Hepatitis C virus seroprevalence in Italian haemophiliacs injected with virus-inactivated concentrates: five year follow-up and correlation with antibodies to other viruses." J Med Virol 33(1): 43-6.
- Preston, F. E., C. R. Hay, et al. (1985). "Non-A, non-B hepatitis and heat-treated factor VIII concentrates." Lancet 2(8448): 213.
- Radkowski, M., J. Kubicka, et al. (2000). "Detection of active hepatitis C virus and hepatitis G virus/GB virus C replication in bone marrow in human subjects." Blood 95(12): 3986-9.
- Re, V. E., A. C. Culasso, et al. (2011). "Phylodynamics of hepatitis C virus subtype 2c in the province of Cordoba, Argentina." PLoS One 6(5): e19471.
- Remis, R. S., M. V. O'Shaughnessy, et al. (1990). "HIV transmission to patients with hemophilia by heat-treated, donor-screened factor concentrate." CMAJ 142(11): 1247-54.
- Rogan, S., Ed. (1991).
- Romero, V. (2008). Aspectos analíticos y epidemiológicos de la infección por Virus de la Hepatitis C en donantes de sangre de la comunidad de Valencia entre 1990 y 2002 Facultad de Ciencias Biológicas. Valencia, UNIVERSITAT DE VALÈNCIA: 218.
- Rosenstraus, M., Z. Wang, et al. (1998). "An internal control for routine diagnostic PCR: design, properties, and effect on clinical performance." J Clin Microbiol 36(1): 191-7.
- Rossen, L., P. Norskov, et al. (1992). "Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions." Int J Food Microbiol 17(1): 37-45.
- Roth, W. K., M. P. Busch, et al. (2012). "International survey on NAT testing of blood donations: expanding implementation and yield from 1999 to 2009." Vox Sang 102(1): 82-90.
- Roussel, P. (1997). "How to develop a quality system." Transfus Clin Biol 4(5): 435-44.

- Sachadyn, P. and J. Kur (1998). "The construction and use of a PCR internal control." *Mol Cell Probes* 12(5): 259-62.
- Saldanha, J., N. Lelie, et al. (1999). "Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group." *Vox Sang* 76(3): 149-58.
- Scott, J. D. and D. R. Gretch (2007). "Molecular diagnostics of hepatitis C virus infection: a systematic review." *JAMA* 297(7): 724-32.
- Scribner, C. L., R. M. Kapit, et al. (1994). "Aseptic meningitis and intravenous immunoglobulin therapy." *Ann Intern Med* 121(4): 305-6.
- Schiff, R. I. (1994). "Transmission of viral infections through intravenous immune globulin." *N Engl J Med* 331(24): 1649-50.
- Schreiber, G. B., S. A. Glynn, et al. (2001). "Incidence rates of viral infections among repeat donors: are frequent donors safer?" *Transfusion* 41(6): 730-5.
- Shepard, R. N., J. Schock, et al. (2000). "Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in different biological compartments." *J Clin Microbiol* 38(4): 1414-8.
- Simmonds, P., J. Bukh, et al. (2005). "Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes." *Hepatology* 42(4): 962-73.
- Smith, D. B., E. Lawlor, et al. (1999). "A second outbreak of hepatitis C virus infection from anti-D immunoglobulin in Ireland." *Vox Sang* 76(3): 175-80.
- Smith, D. B., J. Mellor, et al. (1995). "Variation of the hepatitis C virus 5' non-coding region: implications for secondary structure, virus detection and typing. The International HCV Collaborative Study Group." *J Gen Virol* 76 (Pt 7): 1749-61.
- Stramer, S. L., S. A. Glynn, et al. (2004). "Detection of HIV-1 and HCV infections among antibody-negative blood donors by nucleic acid-amplification testing." *N Engl J Med* 351(8): 760-8.
- Surveill, E., Ed. (2006). New case of transfusion-associated vCJD in the United Kingdom. Euro Surveill.
- Surveill, E., Ed. (2007). Fourth case of transfusion-associated vCJD infection in the United Kingdom. Euro Surveill.
- Velati, C., L. Romano, et al. (2008). "Impact of nucleic acid testing for hepatitis B virus, hepatitis C virus, and human immunodeficiency virus on the safety of blood supply in Italy: a 6-year survey." *Transfusion* 48(10): 2205-13.
- Villanova, G. V., D. Gardiol, et al. (2007). "Strategic approach to produce low-cost, efficient, and stable competitive internal controls for detection of RNA viruses by use of reverse transcription-PCR." *J Clin Microbiol* 45(11): 3555-63.
- Wagstaff, W. (1998). "GMP in blood collection and processing." *Vox Sang* 74 Suppl 2: 513-21.
- WalkerPeach, C. R., M. Winkler, et al. (1999). "Ribonuclease-resistant RNA controls (Armored RNA) for reverse transcription-PCR, branched DNA, and genotyping assays for hepatitis C virus." *Clin Chem* 45(12): 2079-85.
- Weiner, A. J., M. A. Truett, et al. (1990). "HCV testing in low-risk population." *Lancet* 336(8716): 695.
- WFH. (2003). "Guide for Assessment of Clotting Factor Concentrates for the Treatment of Hemophilia, World Federation of Hemophilia (WWW document. URL www.wfh.org)".

- Williams, M. D., S. J. Skidmore, et al. (1990). "HIV seroconversion in haemophilic boys receiving heat-treated factor VIII concentrate." *Vox Sang* 58(2): 135-6.
- Won, D. I., J. Y. Park, et al. (2001). "Comparison of the reverse transcription-PCR with the branched DNA assay for measurement of human immunodeficiency virus type 1 RNA levels in plasma of Korean patients." *Yonsei Med J* 42(2): 204-8.
- Yu, M. Y., B. L. Mason, et al. (1994). "Detection and characterization of hepatitis C virus RNA in immune globulins." *Transfusion* 34(7): 596-602.
- Zou, S., K. A. Dorsey, et al. (2010). "Prevalence, incidence, and residual risk of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus infections among United States blood donors since the introduction of nucleic acid testing." *Transfusion* 50(7): 1495-504.
- Zucchi, A. C. (2005). Control de marcadores virales en el plasma humano: estudio de las causas de las discrepancias entre los resultados obtenidos en distintas instituciones (bancos de sangre e industria farmacéutica) Córdoba, Argentina.