

Influencia de la conservación de la muestra en la cuantificación del ARN viral de la hepatitis C



Influence of sample conservation on quantification of Hepatitis C Virus RNA

La hepatitis C es un problema de salud pública mundial; afecta a más de 100 millones de personas y provoca entre 350.000 y 500.000 muertes anuales¹. Además, el número de afectados crece a un ritmo anual del 6,5%². La aparición de los nuevos agentes antivirales directos con altas tasas de eficacia ha modificado radicalmente el pronóstico de los pacientes, aunque a un coste económico muy elevado³.

En estos tratamientos, la cuantificación de la carga viral es un indicador básico a la hora de establecer la eficacia o la duración del tratamiento⁴. Hemos evaluado la relación entre el tiempo de conservación de las muestras con un inóculo viral pequeño y la cuantificación de la viremia mediante un estudio experimental simple ciego, con 25 muestras de sangre —anticoagulada con EDTA— de pacientes sin infección por el virus, inoculadas con una cantidad conocida del mismo virus (aproximadamente 2.300 UI/ml de un virus genotipo 1b aislado de un paciente de nuestro hospital). Tras agitación de la muestra, se hicieron 3 alícuotas y se procesaron de forma diferente: la primera fue centrifugada inmediatamente y el plasma congelado a -80°C (método de referencia); la segunda y la tercera fueron sometidas al mismo procedimiento tras incubaciones a 25°C de 6 y 24 h, respectivamente. Se cuantificó el número de copias virales mediante COBAS® Ampliprep/COBAS® TaqMan® HCV Quantitative v2.0 (Roche Diagnostics). Las 3 alícuotas de cada muestra inicial fueron analizadas en la misma serie analítica.

Tras el análisis de los datos mediante el programa SPSS v.19, se calcularon las medias de las diferencias y los coeficientes de correlación intraclase (CCI), comparando las cargas virales en las muestras almacenadas 6 y 24 h a 25°C frente a las muestras de referencia (congeladas a las 0 h); además, se compararon entre sí las muestras almacenadas 6 y 24 h (tabla 1).

La media/desviación estándar de carga viral de los 3 experimentos fue: 2.321/635; 2.130/609, y 1.706/362 copias/ml, respectivamente. Tras 6 y 24 h a 25°C , la carga viral sufre una disminución, en promedio, de 191 UI/ml (9,13%) y de 615 UI/ml (26,9%), respectivamente (tabla 1). Aplicando los criterios de Fleiss⁵, los niveles de concordancia con la carga viral de referencia son regular-buena para la medida tras 6 h a 25°C , pero se observa una baja concordancia tras 24 h a 25°C (tabla 1).

Nuestro estudio confirma la necesidad de establecer un sistema de extracción y transporte de las muestras que asegure que estas no permanecen mucho tiempo a temperatura ambiente, ya que de lo contrario disminuye el ARN viral presente en la muestra⁶. Existen resultados discrepantes en la literatura; algunos autores han comunicado que el ARN viral es estable a temperatura ambiente, pero

generalmente estos trabajos están realizados con concentraciones virales elevadas, del orden de 10^6 UI/ml —lo que no se corresponde con la situación clínica de pacientes que reciben tratamiento antiviral⁷— o estudian la estabilidad del ARN del VHC en la muestra ya procesada (centrifugada y separada), lo que tampoco coincide con la realidad de la práctica clínica⁸. Otros estudios que incluyen concentraciones bajas de virus indican estabilidad viral a 4°C durante unas 72 h⁶, pero en diferentes contextos no tan exigentes como el planteado con los nuevos tratamientos⁹.

Nuestro trabajo señala que la fase preanalítica puede afectar negativamente de forma significativa al mismo y por tanto, en algunos casos, estos errores metodológicos pueden influir en el manejo clínico de los pacientes, ya que pequeñas variaciones en los resultados analíticos pueden hacer cambiar la actitud terapéutica¹⁰. Por tanto, para dar fiabilidad a los datos que condicionan el tratamiento de estos pacientes, es imprescindible controlar las variables que puedan influir en los resultados de la cuantificación viral, como el tiempo que transcurre hasta la centrifugación de la muestra y la temperatura de conservación de la muestra durante el transporte, ya que el elevado coste que estos nuevos tratamientos suponen para el sistema sanitario obliga a que se utilicen con la máxima eficiencia.

Bibliografía

1. Maasoumy B, Cobb B, Bremer B, Luk K, Halfon P, Aslam S, et al. Detection of low HCV viraemia by repeated HCV RNA testing predicts treatment failure to triple therapy with telaprevir. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39:85–92.
2. Zalesak M, Francis K, Gedeon A, Gillis J, Hvidsten K, Kidder P, et al. Current and future disease progression of the chronic HCV population in the United States. *PLoS One.* 2013;8:e63959.
3. Hagan LM, Schinazi RF. Best strategies for global HCV eradication. *Liver Int.* 2013;33 Suppl:68–79.
4. Rong L, Perelson AS. Mathematical analysis of multiscale models for hepatitis C virus dynamics under therapy with direct-acting antiviral agents. *Math Biosci.* 2013;245:22–30.
5. Fleiss JL. *The Design and Analysis of Clinical Experiments.* New York: John Wiley & Sons; 1986.
6. Gessoni G, Barin P, Valverde S, Giacomini A, Di Natale C, Orlandini E, et al. Biological qualification of blood units: Considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids. *Transfus Apher Sci.* 2004;30:197–203.
7. Comert F, Aktas E, Terzi HA, Kulah C, Ustundag Y, Kokturk F, et al. Evaluation of hepatitis C virus RNA stability in room temperature and multiple freeze-thaw cycles by COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HCV. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:81–5.
8. Abida Raza ZA. Analytical variables influencing the HCV RNA determination by TaqMan real-time PCR in routine clinical laboratory practice. *Mol Biol Rep.* 2012;39:7421–7.
9. Doerrbecker J, Meuleman P, Kang J, Riebeschl N, Wilhelm C, Friesland M, et al. Thermostability of seven hepatitis C virus genotypes in vitro and in vivo. *J Viral Hepat.* 2013;20:478–85.
10. Vermehren J, Aghemo A, Falconer K, Susser S, Lunghi G, Zeuzem S, et al. Clinical significance of residual viremia detected by two real-time PCR assays for response-guided therapy of HCV genotype 1 infection. *J Hepatol.* 2014;60:913–9.

Tabla 1

Media de las diferencias de carga viral en UI/ml y su desviación estándar; coeficiente correlación intraclase^a. Entre paréntesis se indica el intervalo de confianza al 95% tanto de la media de las diferencias como del coeficiente correlación intraclase

	Media de las diferencias UI/ml (IC 95%)	SD	CCI (IC 95%)
Entre 0 y 6 h	–212,0 (–474,10; 50,10)	634,00	0,457 (0,099; 0,714)
Entre 6 y 24 h	–412,88 (–645,77; –179,99)	564,21	0,256 (–0,079; 0,564)
Entre 0 y 24 h	–624,88 (–871,95; –377,81)	598,56	0,207 (–0,101; 0,519)

CCI: coeficiente correlación intraclase; IC: intervalo de confianza; SD: desviación estándar.

^a Modelo alfa de 2 factores y efectos mixtos con acuerdo absoluto.

María Carmen Bernal-Soriano^{a,*}, Adelina Gimeno^a,
Jose Sánchez-Paya^{b,c} y Joaquín Portilla^{c,d}

^a Servicio de Microbiología, Hospital General Universitario
de Alicante, Alicante, España

^b Servicio de Medicina Preventiva, Hospital General Universitario
de Alicante, Alicante, España

^c Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante, España

^d Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital General
Universitario de Alicante, Alicante, España

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: c.bernal.86@gmail.com (M.C. Bernal-Soriano).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.012>