

VI CONGRESO DEL GRUPO COOPERATIVO IBERO-AMERICANO DE MEDICINA TRANSFUSIONAL G-CIAMT

06 - 11 de junio 2009

**METODOS MOLECULARES DE
INNOVACION EN BANCO DE
SANGRE**

Dr. César Sánchez Zúñiga

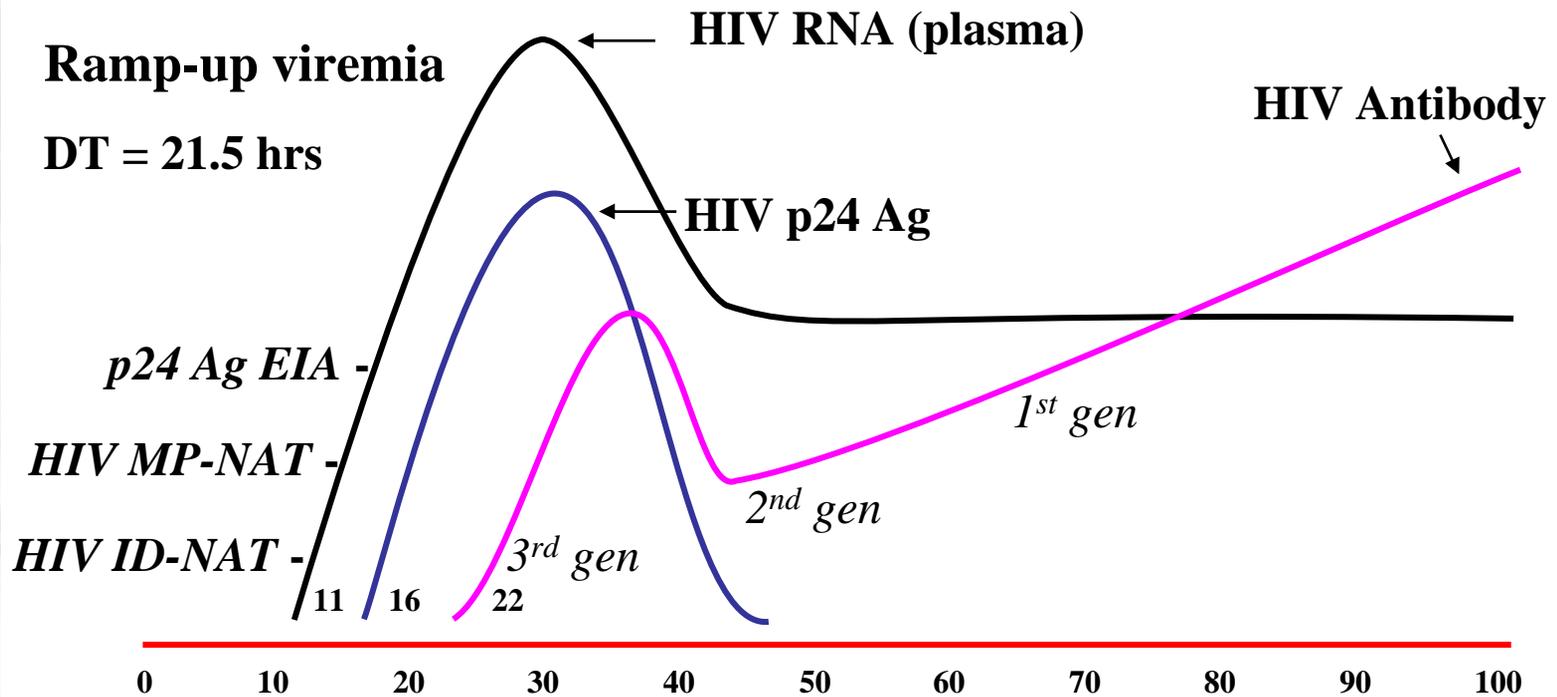
**Laboratorio de Biomedicina Molecular Celular e
Investigacion
HNGAI-EsSALUD**



El riesgo de transmisión viral asociado a transfusiones de sangre ha disminuido en las pasadas décadas debido a:

- ❖ Mejoramiento en la selección de donantes
- ❖ Métodos de inactivación viral.
- ❖ Aparición de métodos de tamizaje mas sensibles.
- ❖ Incorporación de sistemas de control de calidad de procesos.

Marcadores de HIV durante la infección temprana



Busch et al

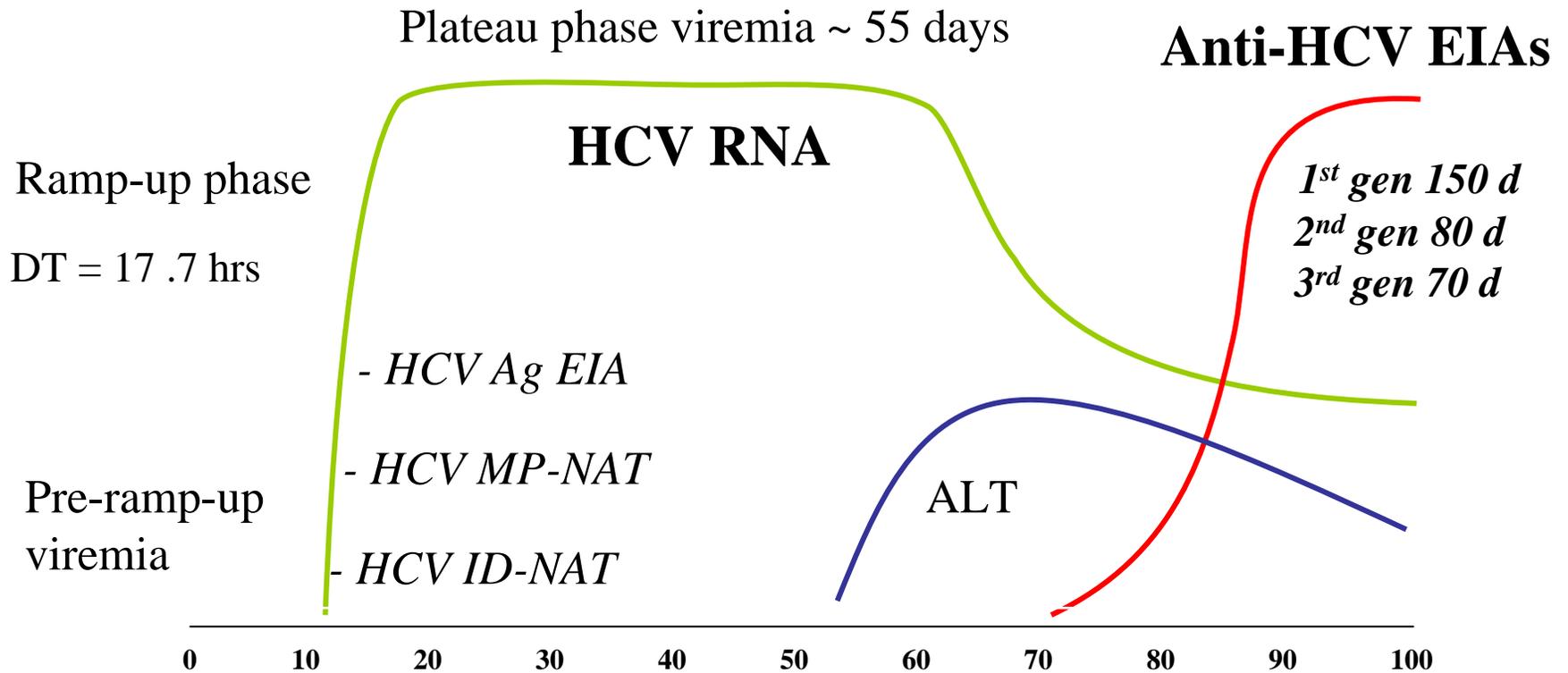
Ventanas de seroconversión para HIV



Virus	Prueba	Reducción de la ventana	Riesgo residual / Millón	Estimación de casos / año
HIV	p24 Ag	6 días	1.48	7
	DNA PCR	6 días	1.48	7
	RNA PCR	11 días	1.01	12
HBV	DNA PCR	25 días	8.33	84
HCV	RNA PCR	59 días	2.72	81

Basado en REDS, NHLBI Retrovirus Epidemiology Study
Busch, Kleinman, Korelitz, Schreiber

Marcadores de HCV durante la infección temprana



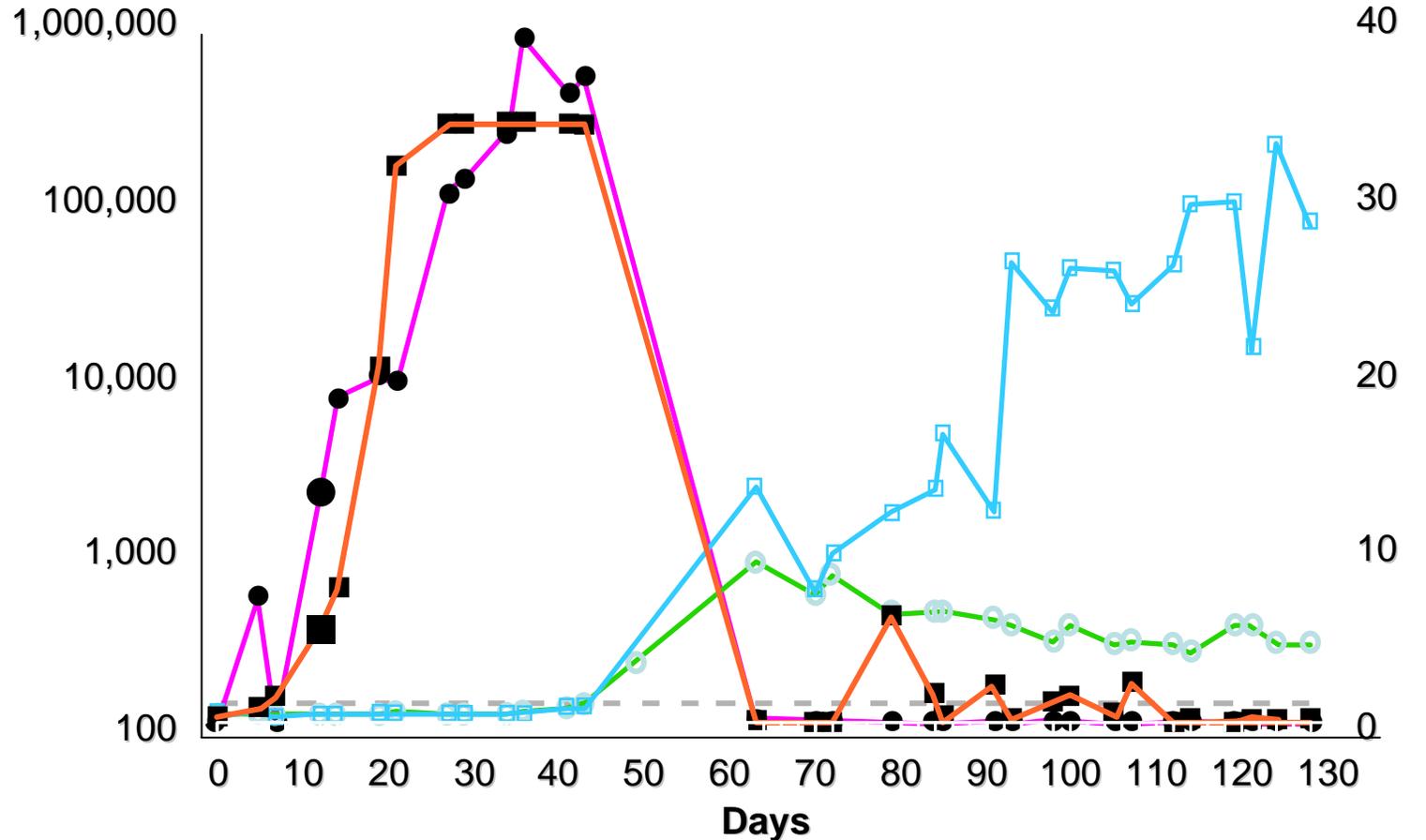


Ventanas de seroconversión para HCV

Prueba	Dias
HCV Ab 1.0	98
HCV Ab 2.0	82
HCV Ab 3.0	70
ALT	53
RNA PCR	14

Perfil de la infección HBV aguda

HBV DNA Copies/mL

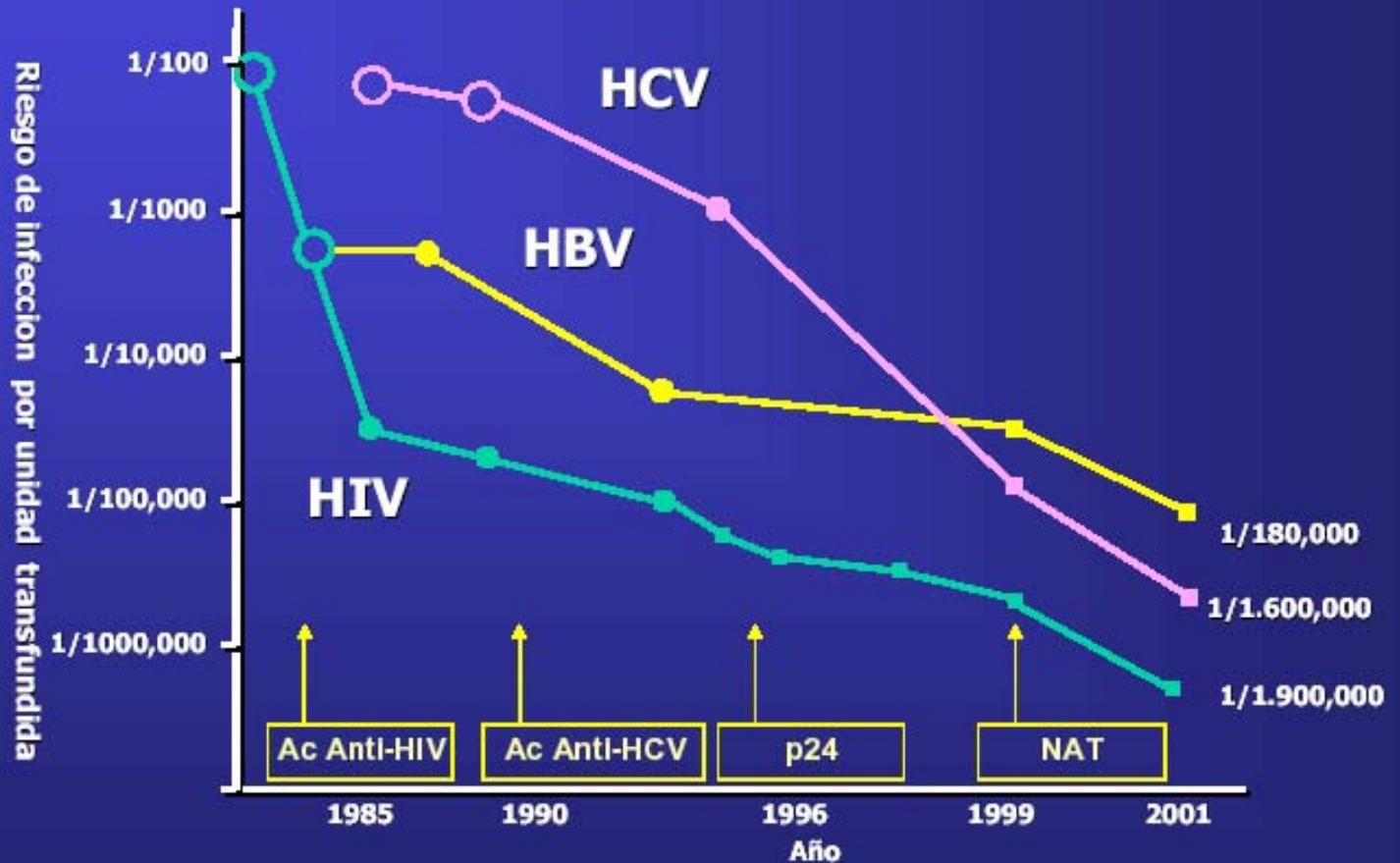




A PESAR DE LA REALIZACIÓN DEL TAMIZAJE DE MARCADORES SEROLÓGICOS LA TRANSMISIÓN PUEDE OCURRIR:

- ❖ Donación de sangre durante el período de ventana.
- ❖ Donantes asintomáticos portadores crónicos de una infección transmisible con resultados persistentemente negativos en las pruebas de laboratorio y/o seroconversiones atípicas.
- ❖ Infección por mutantes o cepas raras, tampoco detectables por las pruebas utilizadas.
- ❖ Errores humanos o de laboratorio: calidad de los equipos utilizados y recurso humano calificado.

Evolución del riesgo en la provisión de sangre



Bacterial Contamination of Blood Components: Risks, Strategies, and Regulation Hillyer et al. Joint ASH and AABB Educational Session in Transfusion Medicine. *Hematology* 2003



Detección de ARN /DNA viral en suero/plasma (NAT)



Tests de ácidos nucleicos (NAT)

- ❖ Basados en amplificación de secuencias de ácidos nucleicos; tienen alta sensibilidad y especificidad.
- ❖ Detectan el ADN o el ARN de el agente etiológico, independientemente de la respuesta inmune (tests de anticuerpos); la amplificación ocurre en el tubo de ensayo, no en el donante o paciente.
- ❖ Capaces de detectar un pequeño número de copias. Teóricamente, dependiendo de la cantidad de muestra y del número de repeticiones.

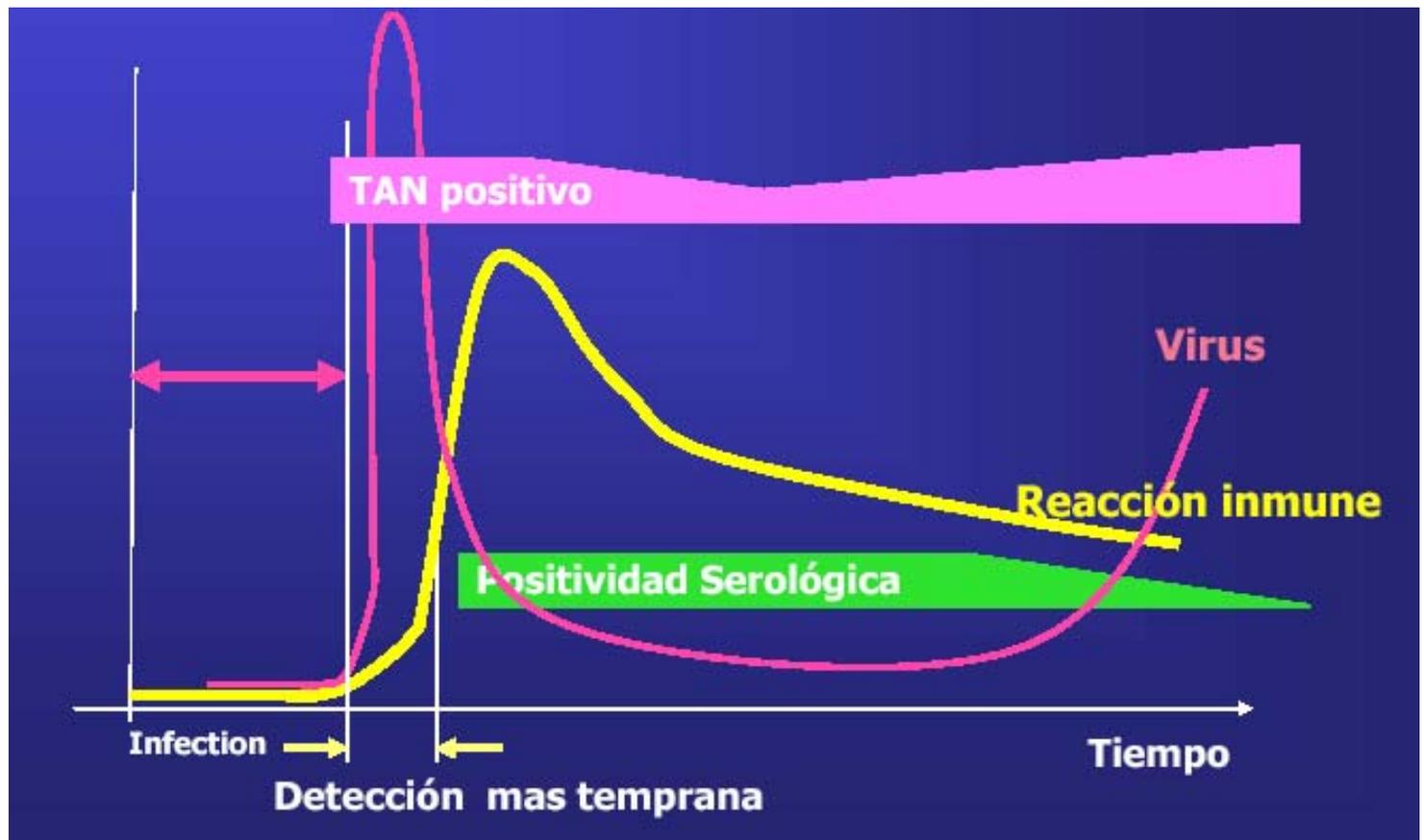


Tests de ácidos nucleicos (NAT)

- ❖ Son positivos en período de viremia en la ausencia, o en la presencia de bajo título de anticuerpos
- ❖ La sensibilidad mínima requerida por la FDA para tests para VIH e VHC es de 100 copias/ml
- ❖ Para HBV , FDA está considerando requerimiento de detección de 10 copias/ml, 95% de las veces
- ❖ La altísima sensibilidad, puede ser insuficiente para detectar donaciones con baja viremia que transmiten infección porque el volumen del inoculo (la transfusión) es muy alto (>250 ml)

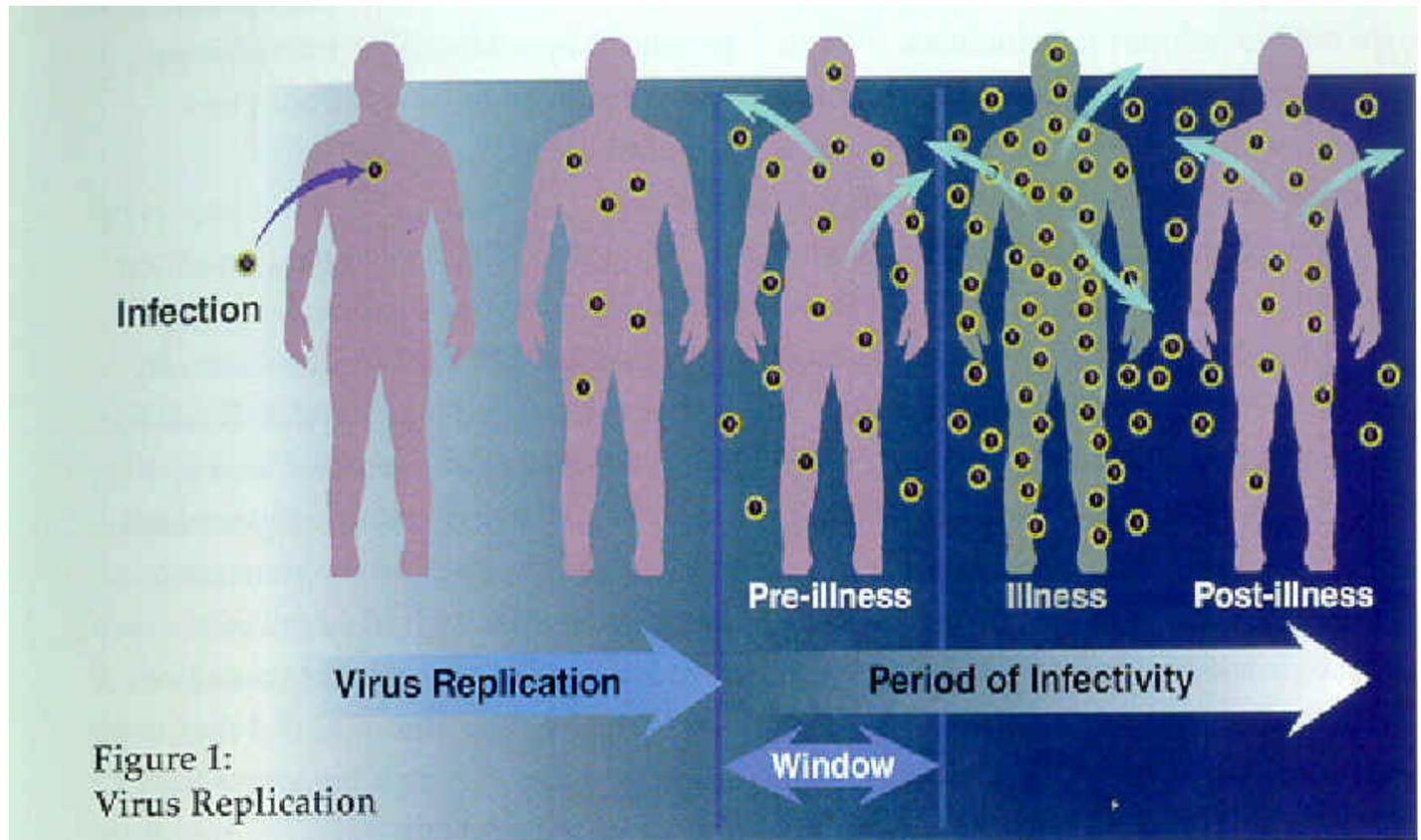
OBJETIVOS DEL NAT

Reducción del “*período ventana*”





Periodo ventana de una infección viral





Técnicas NAT

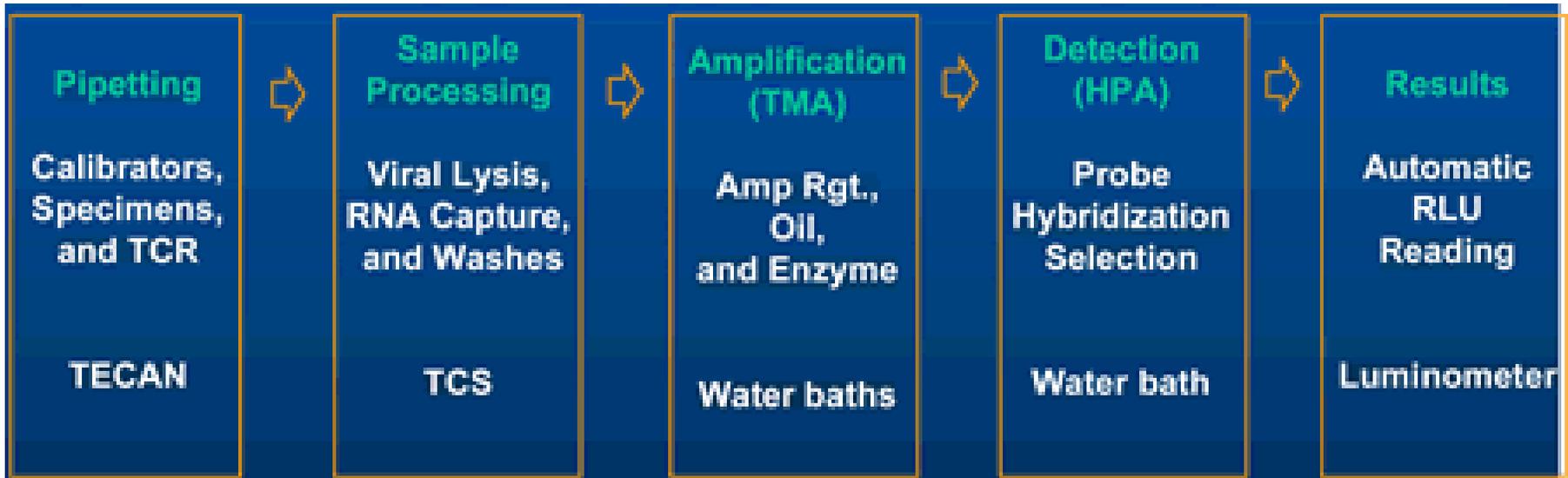
- **PCR** (Reacción en cadena de la polimerasa)
- **3SR** (Replicación de secuencia autosostenida)
- **NASBA** (Amplificación basada en secuencia de ácidos nucleicos)
- **SDA** (Amplificación por desplazamiento de cadena)
- **Q β replicasa** (amplificación de la replicasa Q beta)
- **LCR** (Ligase chain reaction)

Técnicas del NAT

- **Amplificar dianas de RNA** (HCV y HIV):
 - Amplificación basada en secuencia de nt (NASBA)
- **Amplificar dianas de DNA o cDNA:**
 - PCR (VIH, CMV, virus de la hepatitis B, papilomavirus, hantavirus, herpes 6 y 8, gran variedad de patógenos bacterias, parásitos.)
 - LCR (Mycobacterium tuberculosis, Borrelia burgdorferi, Neisseria gonorrhoeae y N. meningitidis)
- **Amplificar material genómica en partículas virales:**
 - Branched DNA (HCV, VIH, CMV y hepatitis. Monitorear los niveles de ARN de HCV y VIH durante y después del tratamiento)



Secuencia general de pasos para la tecnología NAT



TECAN



Target Capture System (TCS)



Luminometer

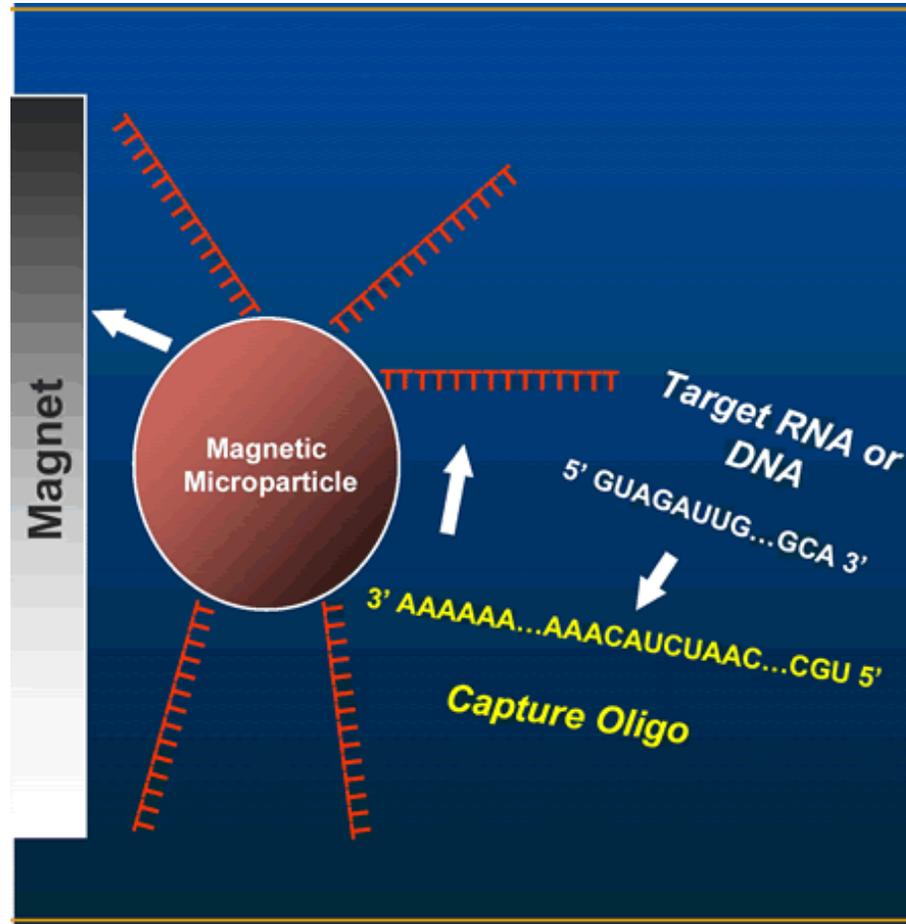


Amplificación basada en secuencia: **NASBA**

- **A. isotérmica** del ARN basada en la transcripción (41°C)
- Detección basada en un método de quimioluminiscencia.
- **No requiere termociclador**
- Resultados en 1 hr
- Enzimas: T7 RNA polimerasa y RNAsa H
- Genera RNA antisense (RNA – 5' → 3') a partir de RNA sense (RNA + 3' → 5')
- Genera de 100 a 1000 amplicones de RNA por ciclo

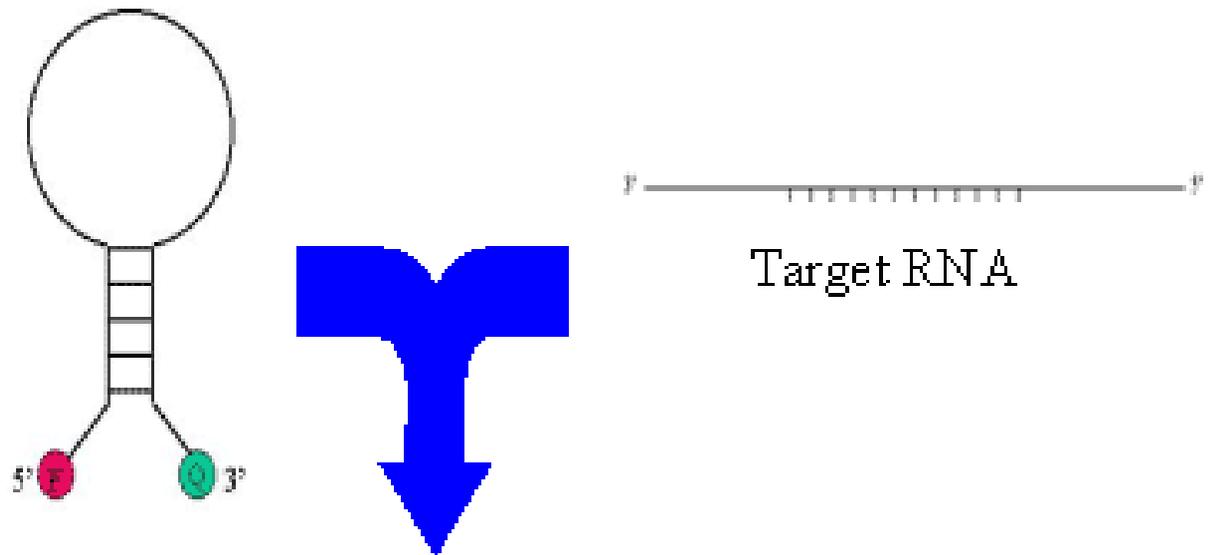


- Para aislar muestra inicial: captura de la diana por separación con micropartículas magnéticas.

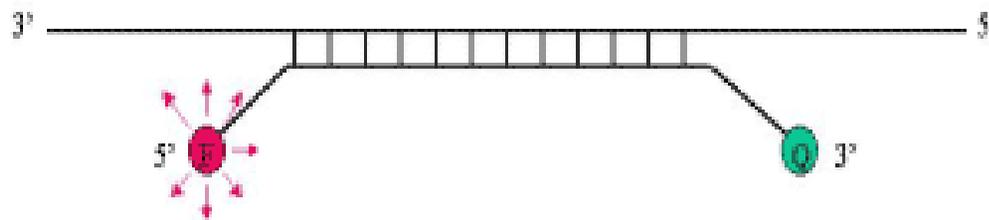


- NASBA emplea sondas beacons

Unbound: No Fluorescence



Bound to Target: Fluorescent

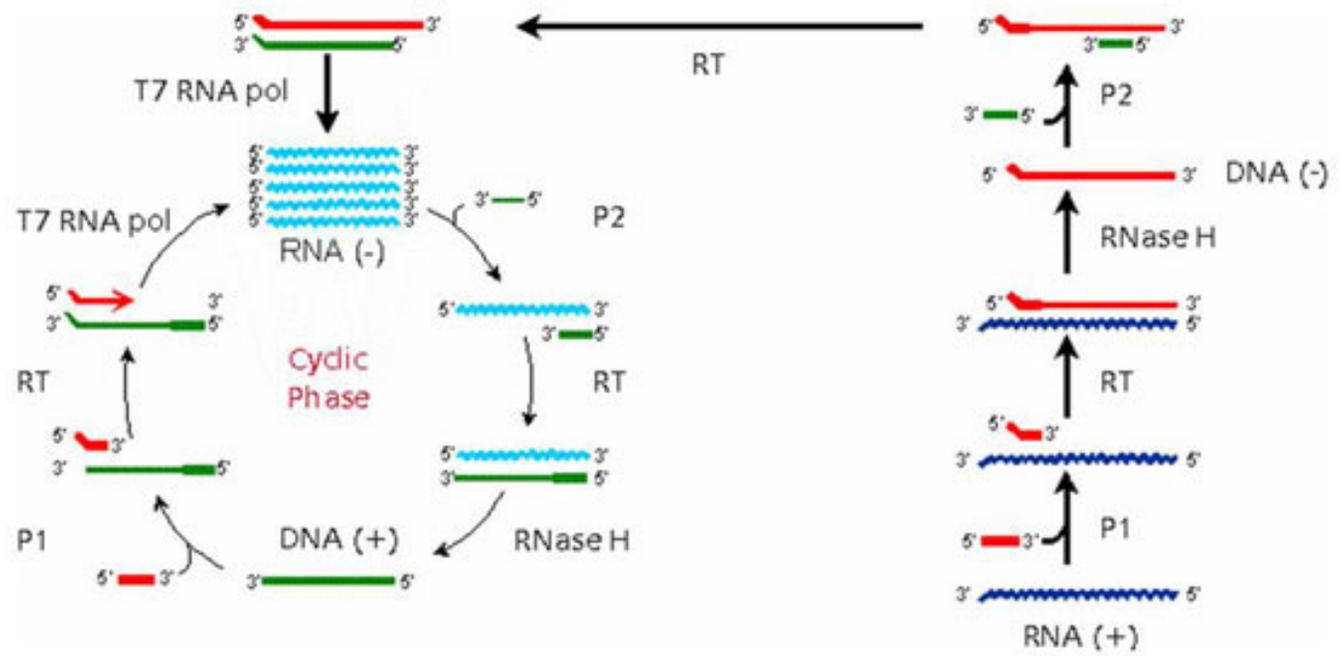




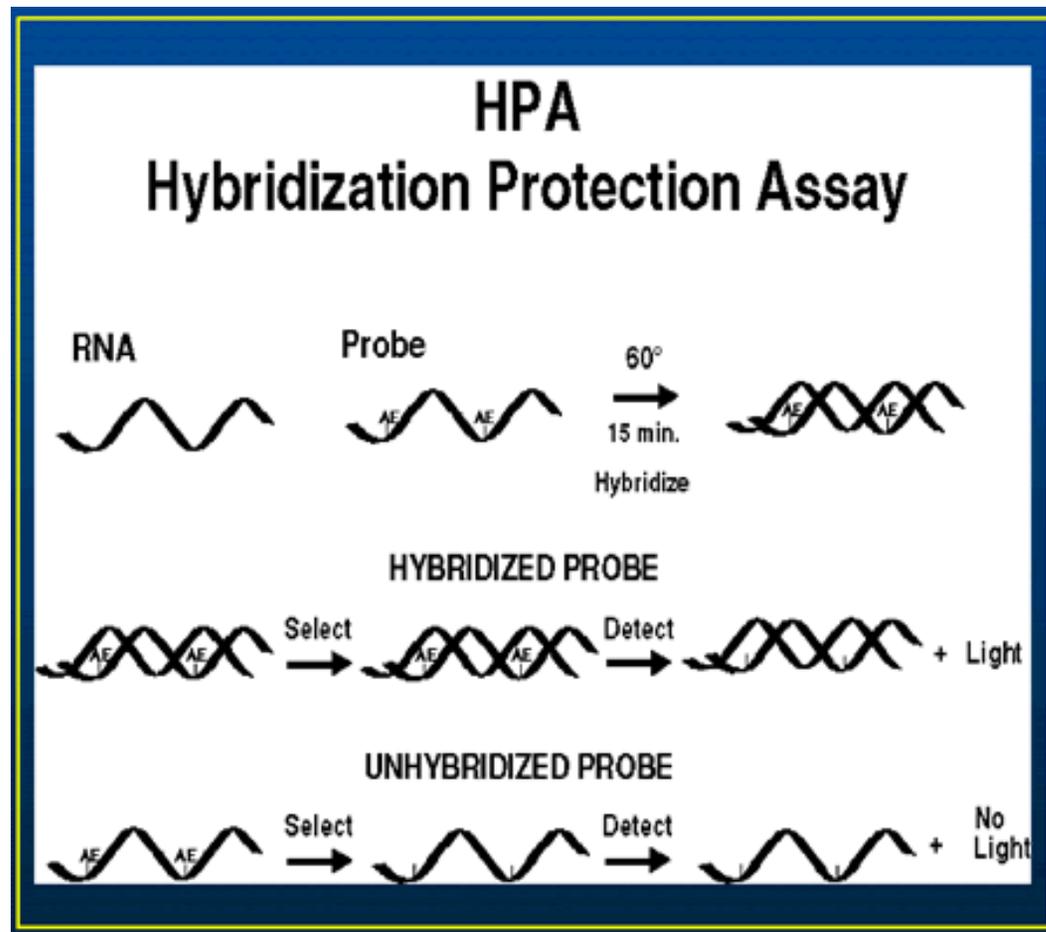
- 1 de los iniciadores contiene un promotor que necesita la ARN-polimerasa T7
- Enzima sintetiza ARN a partir de ADNc.
- Amplicones detectados usando sondas beacon que fluorescen luego de la unión a secuencia diana.
- Usan 2 sondas marcadas con distintos fluoroforos: diferenciar amplicones diana y calibradores.



NASBA principle



Detección: emisión de luz por parte de átomos de rutenio unidos al ARN amplificado, que se cuantifica y extrapola sobre una recta obtenida a partir de la emisión de los calibradores.



Reacción en cadena de la ligasa (LCR)

- Ciclos repetidos de hibridación de oligos y de ligación, para generar múltiples copias de la secuencia de ácidos nucleicos.
- **Dos parejas de sondas complementarias:** hibridarán en posiciones adyacentes en cada hebra del ADN diana.
- El complejo diana-sondas será el sustrato para la unión por medio de la ADN ligasa gracias a su actividad **selladora de brechas**.

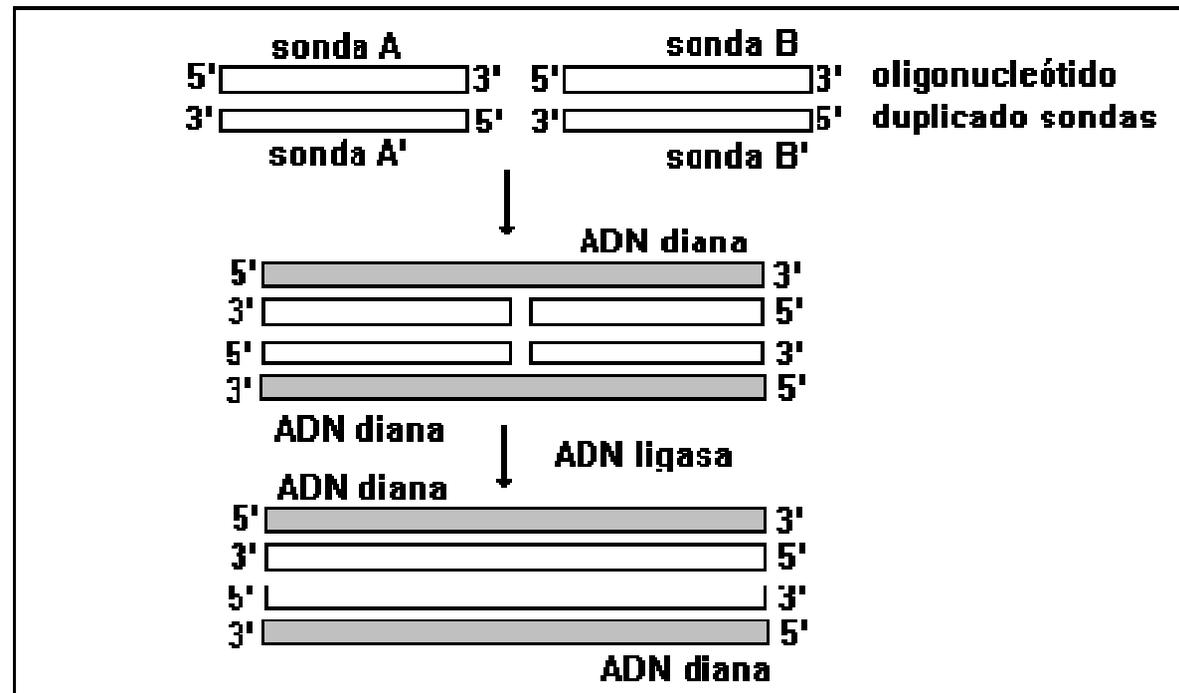
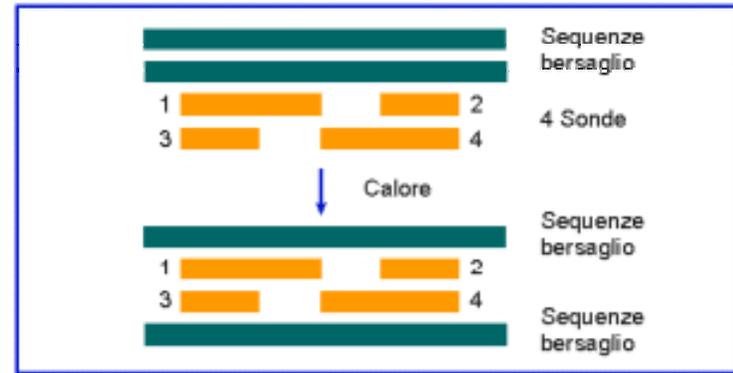


Figura 3. LCR

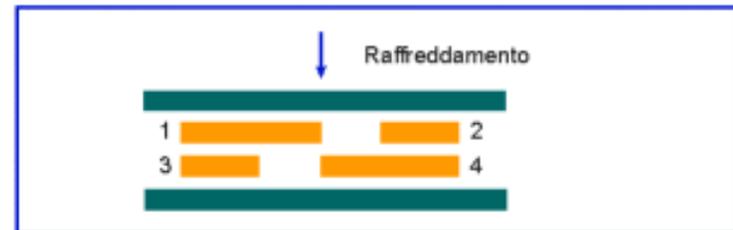


- Una vez producida la ligación, el producto resultante puede ser separado mediante desnaturalización por calor.
- Tanto la hebra de ADN monocatenario como el producto ligado servirán de moldes adicionales.
- En teoría en cada ciclo se duplicará el número de copias.

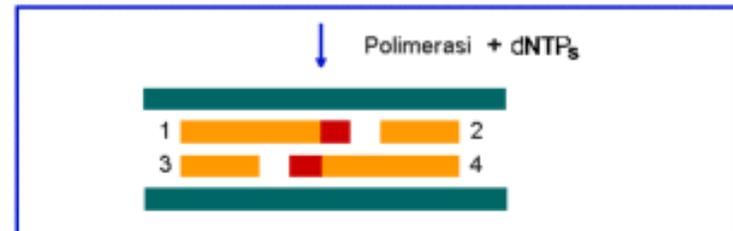
1° passaggio: denaturazione mediante calore



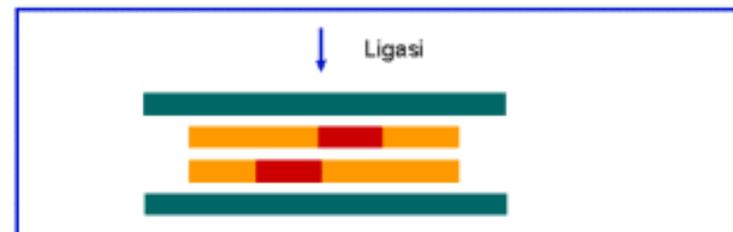
2° passaggio: rinaturazione mediante raffreddamento



3° passaggio: riempimento dello spazio vuoto



4° passaggio: legame

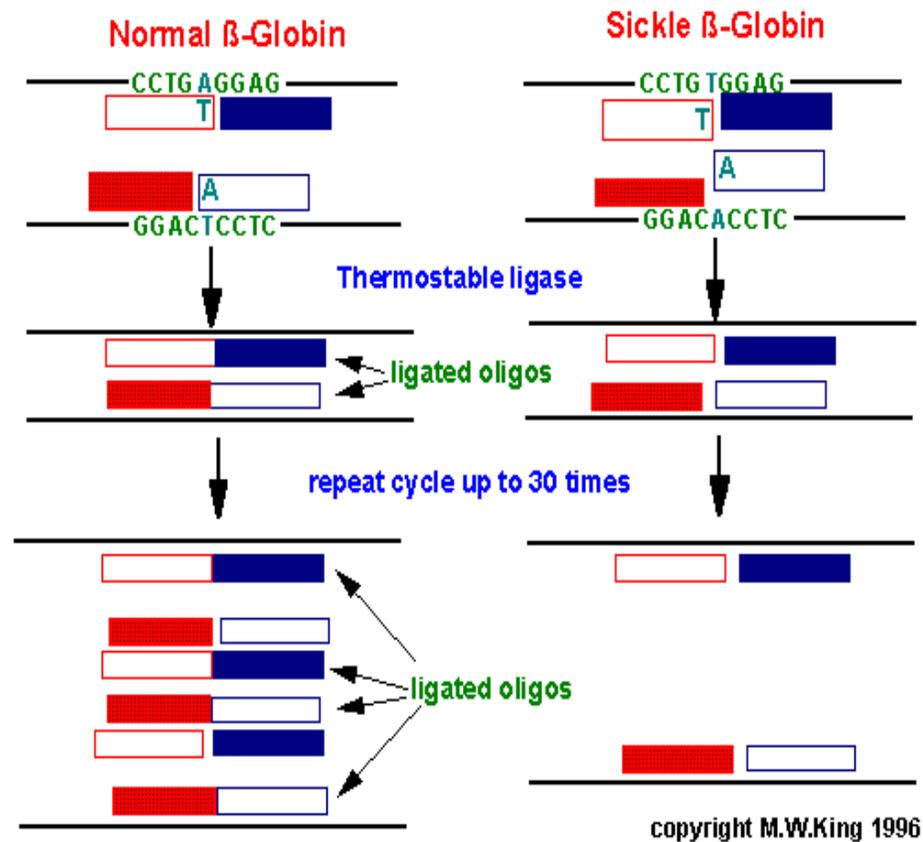




- Difiere de los métodos de amplificación basados en la polimerasa (PCR, NASBA) en que no se produce síntesis de ADN o ARN “nuevo”.
- La diana no es duplicada, simplemente sirve de molde para la reorganización de sondas preexistentes
- Las sondas una vez organizadas y ligadas servirán de sustrato para nuevas reacciones.



- La LCR se ha utilizado para la detección de varios agentes infecciosos (papillomavirus, HIV-1, *Mycobacterium tuberculosis*)
- Detecta mutaciones puntuales en genes relacionados con la aparición de enfermedades genéticas
- Elevado grado de especificidad.



copyright M.W.King 1996

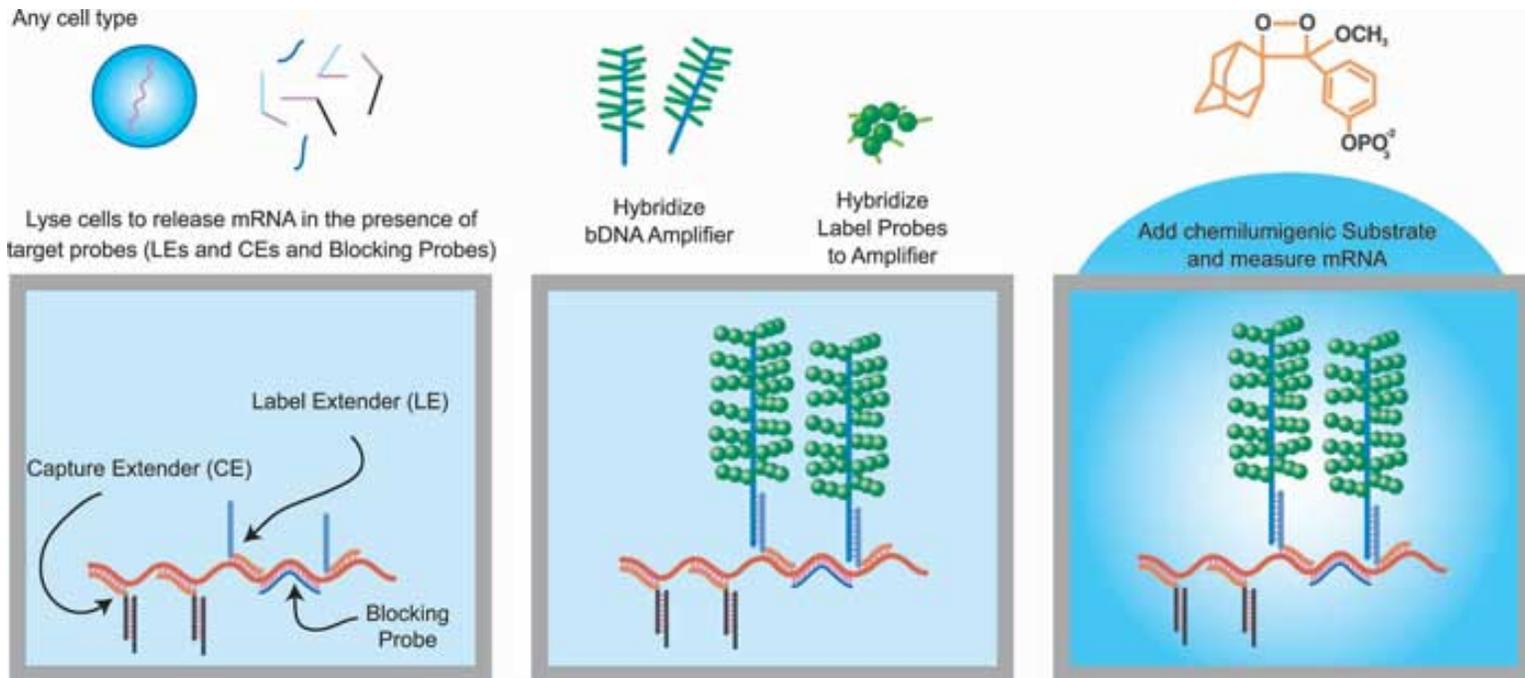
Branched DNA

- El material inicial son **los viriones**, no el ARN plasmático total.
- Se **amplifica la señal en** lugar del blanco de ácido nucleico, esto se hace mediante pasos sucesivos de hibridización
- No está basado en PCR
- El ácido nucleico extraído se fija en una microplaca que contiene sondas específicas
- El complejo ARN-sondas se le unen sondas de ADN con 15 ramificaciones, a cada una de las cuales se unen 3 sondas marcadas capaces de emitir luz al añadir un sustrato.
- Sondas de captura (o bloqueo) y sondas amplificadoras (ramificadas)

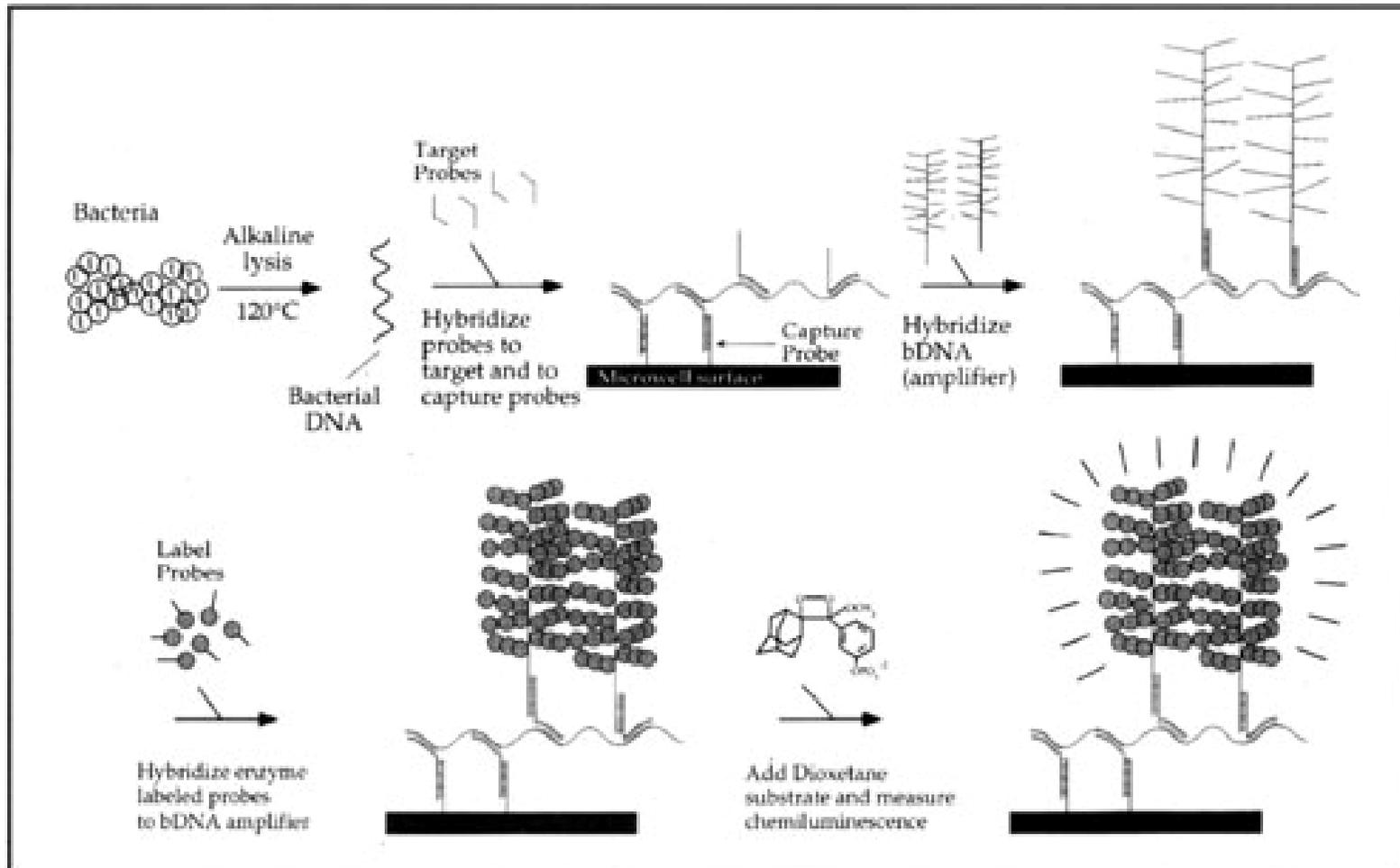




- Este bADN tiene múltiples cadenas ramificadas a manera de árbol y cada una de estas ramas es un sitio de hibridización con una **sonda marcada con una enzima**, que reacciona con un sustrato que permite la demostración colorimétrica o quimioluminiscente



Branched DNA: Genotipos en población viral diversa





NAT en banco de sangre

- Dos sistemas de pruebas utilizados para el escrutinio de los donadores de sangre:
 - *Roche Molecular Systems Cobas Ampliscreen* para HCV y HIV
 - *GenProbe Pooled Plasma HIV-1/HCV Amplified Assay* (America's Blood Centers, 1999).

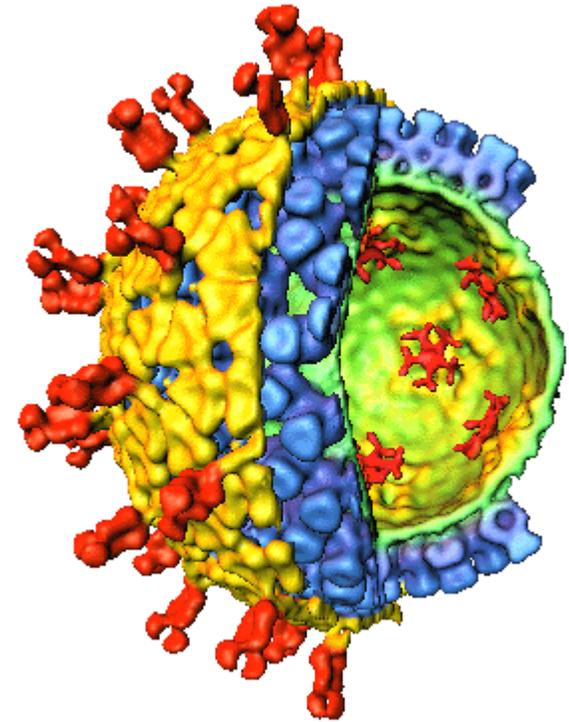


NAT para HIV-1 y HCV en donadores de sangre

- Preparación de la muestra
- Amplificación de RNA dianas (HIV-1 y HCV).
- Detección de los productos amplificados (amplicones).

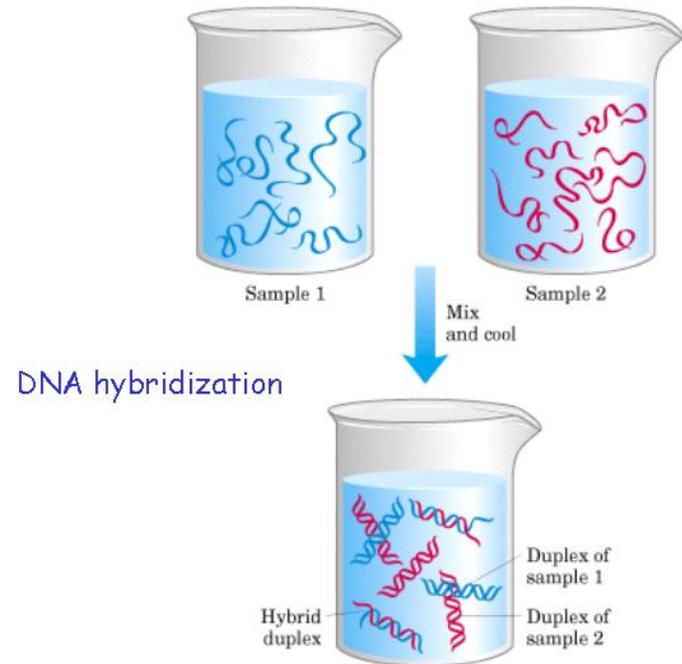
NAT: Preparación de muestra

- Las muestras de sangre colectadas de donadores se tratan con detergente para solubilizar la envoltura viral, denaturar proteínas y liberar RNA genómico.



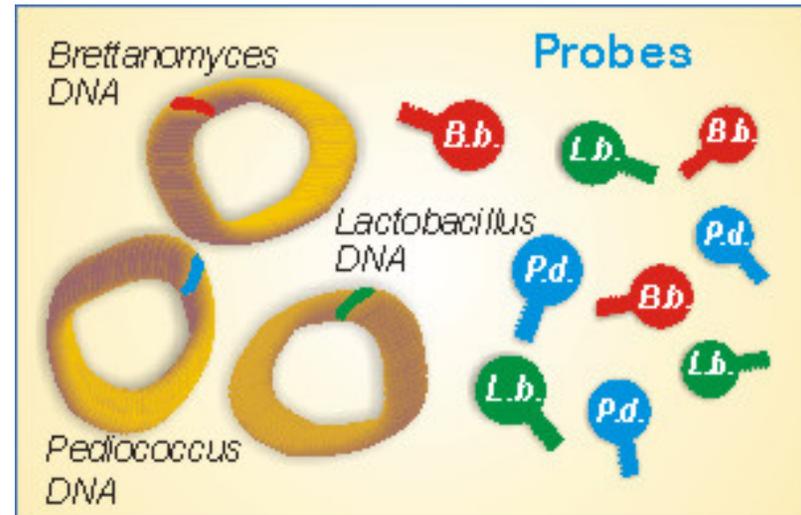
NAT: Oligos y amplificación

- Oligos homologos complementarios a regiones altamente conservadas del gen de polimerasa en el genoma de HCV y HIV.
- Los híbridos formados son adsorbidos a micropartículas magnéticas y separados del plasma por un campo magnético
- **Amplificación mediada por transcripción**, que usa transcriptasa reversa, se usa para amplificar targets HIV-1 y HCV.



NAT: detección

- Una sonda quimioluminescente se hidriza con el amplicón y es detectada por un luminómetro.
- Detección: hibridización de amplicón con su sonda (simple cadena) quimioluminiscente.
- Luminómetro: detecta presencia de señales producidas por sondas hibridizadas.



NAT: interpretación

- En cada reacción se adiciona un control interno para asegurar todas las etapas del proceso.
- Si la prueba es positiva: pruebas discriminatorias para diferenciar entre los dos virus, HIV-1 y HCV, con el mismo proceso.
- La duración total de la técnica es de aproximadamente 5 horas y media.

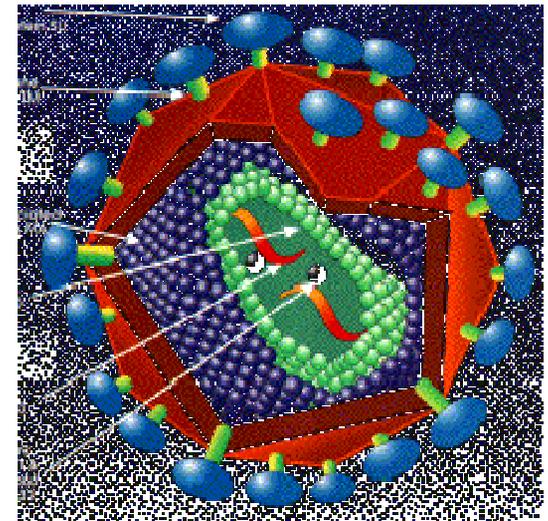
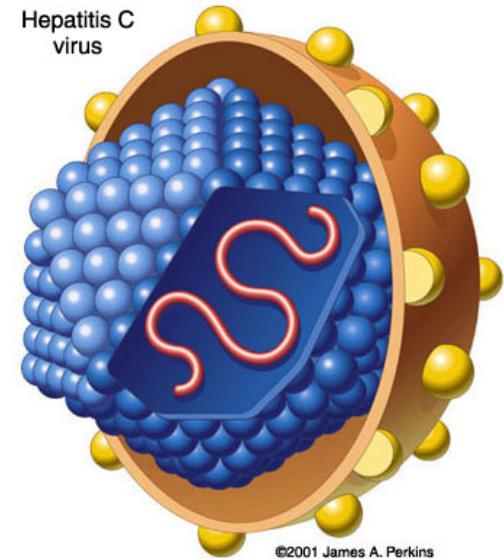


Nucleic Acid Testing (NAT) reduces the window period for detecting Hepatitis C and HIV.



Discriminación

- Detección de presencia de genomas virus HIV o HCV pero **NO PUEDE DIFERENCIARLOS**.
- Ensayos de discriminación sobre las muestras encontradas reactivas en los ensayos múltiples: determinar si son positivas para HIV, HCV o ambos.
- Mismo procedimiento básico de ensayo múltiple: sondas específicas para HIV y HCV se usan de forma separada, no juntas



Limitaciones económicas y técnicas

- (1) NAT requiere **personal entrenado** Y equipos que no es común en los bancos de sangre.
- (2) La prevención de la contaminación cruzada de amplicones entre muestras requiere que la preparación de reactivos, manejo de las muestras, amplificación genómica y detección, sean llevados a cabo en **ambientes separados**.
- (3) Los ensayos de NAT comercialmente disponibles **requieren más tiempo** que las pruebas actualmente utilizadas (24 a 36 hr después de recolección).



Transmissible Disease Testing from samples collected at Donation.



Limitaciones económicas y técnicas

- (4) El **costo de cada prueba** de NAT comercial es aproximadamente 10 veces mayor que la prueba de EIA más cara.
- (5) Algunos virus pueden ser **concentrados** usando ultracentrifugación, otros no (HCV).
- (6) Algunos virus tienen afinidad por **componentes celulares *in vitro*** (HCV une lípidos presentes en el plasma): pueden ser descartado durante la decantación y etapas de lavado.



Centrifuges are used to separate the components of blood within the original blood donation bag.



Limitaciones logísticas

- Por razones de costo-efectividad, el sistema automatizado no permite ejecutar los ensayos en muestras individuales, así que inicialmente la prueba es llevada a cabo en mezclas de muestras de donadores.
- 50% de las muestras NAT-positivas se espera que sean falsos positivos.



Each unit of blood is leukoreduced to remove the white blood cells.





Futuras aplicaciones

- Plataformas que permitan una detección directa de otros virus (hepatitis B, el parvovirus B-19 y el citomegalovirus) y otros agentes infecciosos como *Trypanosoma*, *Babesia* y las especies de *Plasmodium*.



MUCHAS GRACIAS

Dr. Cesar Sanchez Zuñiga
Laboratorio de Biomedicina Molecular
Celular e Investigacion HNGAI-EsSALUD
csanchezz02@yahoo.es