

PCR en tiempo real: presente y futuro del laboratorio de genética molecular del hospital “Hermanos Ameijeiras”

González-García N; Ortega-Carballosa A; Casanueva-Calero K; García-Menéndez G; Martínez-Echevarría MT; Rangel-Velázquez S
Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”. La Habana, Cuba.
Email: nadezhdagonzalez@gmail.com

RESUMEN

En Cuba se ha acumulado una considerable experiencia las técnicas de PCR en tiempo real (TR) para enfermedades infecciosas; sin embargo, no se han introducido en otros campos diagnósticos. El objetivo del presente trabajo fue exponer las estrategias de implementación y los resultados preliminares en el empleo del PCR-TR en el laboratorio de genética molecular del Hospital “Hermanos Ameijeiras”. Para el aislamiento de ADN y ARN se utilizó el sistema High Pure Template Preparation Kit (Roche). Se emplearon termocicladores Lightcycler 96 y Cobas z480 con estuches de Tibmolbiol, Blackhills Diagnostic Resources y Roche. Los métodos *in house* se desarrollaron con Sybergreen. Los aislamientos de ácidos nucleicos requirieron entre 1 y 2 horas, y todos tuvieron una pureza y concentración adecuadas. Se identificaron micoplasmas en 15 muestras de las 60 procesadas. El genotipaje de HLA-B*27 a 50 individuos identificó 8 casos positivos. La mutación G1691A factor V se encontró en 4 pacientes de 111, la G20210A factor II en 3 de 48, la mthfr A1298C en 5 de 9, la A V34L factor XIII fue en 3 de 9 y no se detectó la mthfr C677T. De 14 casos con sospecha de celiaquía, 11 resultaron HLA-DQB1*02; 6, HLA-DQA1*05; y 1, HLA-DQB1*03:02. Se implementó un PCR-TR *in house* para el virus de la hepatitis B. La *Chlamidia Trachomatis* se cuantificó en 2 muestras de 60 evaluadas. Se estudiaron los reordenamientos BCR/ABL, PML/RAR α , AML1-ETOyCBFb-MYH11 en 19pacientes y se obtuvieron 2 positivos para braf y 4 para kras en tumores. La implementación por primera vez en Cuba del PCR-TR en nuevas áreas de la medicina permitió revolucionar el diagnóstico,

pronóstico y seguimiento de patologías que hasta el momento no contaban con esta herramienta; y creó un precedente para la expansión y fortalecimiento de esta tecnología en el sistema de salud cubano.

Palabras clave: PCR en Tiempo Real, clamidia, micoplasma, virus de la hepatitis B, oncohematología, trombofilia, trombopatía, braf, kras, HLA y enfermedad.

INTRODUCCIÓN

En Cuba se ha acumulado una considerable experiencia en la aplicación de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-TR) para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas; ⁽¹⁾ sin embargo, en el país no se ha introducido esta metodología en otros campos de la medicina.

Durante el año 2016 se incorporó el método de PCR-TR mediante la plataforma Roche en el laboratorio de Genética Molecular del Hospital “Hermanos Ameijeiras” para, además de realizar algunos exámenes microbiológicos, impulsar y revolucionar a nivel nacional el diagnóstico, pronóstico y seguimiento numerosas patologías no infecciosas como las oncohematológicas, las asociadas al HLA, los desórdenes de la coagulación, y la detección de biomarcadores asociados al cáncer.

En el presente trabajo se aborda la estrategia de sustitución de los métodos tradicionales de PCR, mediante la implementación en la práctica clínica del PCR-RT en nuevas enfermedades y tomando como base la experiencia del campo de la microbiología. ⁽²⁾

OBJETIVOS

Exponer las estrategias de implementación y los resultados preliminares en el empleo del PCR-TR en el laboratorio de genética molecular del Hospital “Hermanos Ameijeiras”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó la implementación de la tecnología de PCR-RT mediante la plataforma Roche en el laboratorio de genética molecular del Hospital “Hermanos Ameijeiras” durante el año 2016.

Para el aislamiento de ADN y ARN tanto humanos como de microorganismos se utilizaron los estuches High Pure Template Preparation Kit DNA genomic, RNA genomic y viral RNA (Roche), según correspondiera y siguiendo las normas del fabricante. ⁽³⁾ La concentración y pureza de las muestras se determinó por el método espectrofotométrico empleando un monocromador de microgotas Nano-Drop (Thermo Scientific).

Se utilizaron los estuches específicos LightMix® in-vitro diagnostics kit (Tibmolbiol) tanto para la detección y genotipificación de especies de *Micoplasma* en un termociclador de tiempo real Cobas z480 (Roche); así como para la detección del HLA-B*27, las mutaciones Factor V Leiden, Factor II G20210A, Factor XIII A V34L, *mthfr* A1298C y *mthfr* C677T en un termociclador de tiempo real Lightcycler 96 (Roche).⁽⁴⁾

Para la detección de biomarcadores en tumores, se utilizaron los estuches diagnósticos con certificación IVD (*In vitro diagnostic*) Kras mutation test y Braf mutation test, en el Cobas z480 (Roche); y para la genotipificación de los alelos HLA-DQA1*05, HLA-DQB1*02 y HLA-DQB1*03:02, el estuche HLA CELIAC (Blackhills Diagnostic Resources, S.L) en un Cobas z480 (Roche).⁽⁵⁾

La detección del virus de la Hepatitis B se realizó en un Lightcycler 96 (Roche), mediante un método *in house*, con sondas SyberGreen (FastStart Essential DNA Green Master, Roche) y los cebadores del método PCR-SSP previamente estandarizado en el laboratorio. ⁽¹⁾

Para la detección y cuantificación de *Clamidia Trachomatis* y de los reordenamientos moleculares BCR/ABL, PML/RAR α , AML1-ETO y CBFb-MYH11 se utilizaron los estuches específicos LightMix® in-vitro diagnostics kit (Tibmolbiol) en un Cobas z480 (Roche).

RESULTADOS

El aislamiento de ácidos nucleicos se optimizó con muestras de sangre periférica, médula ósea, suero, hisopados endocervicales, semen y biopsias de tumores de pulmón, colon y páncreas; lo que permitió realizar 325 extracciones de ADN y ARN durante el período de implementación.

En comparación con los métodos anteriores de aislamiento de ADN (precipitación salina) y de ARN (Fenol-Guanidinio), que requerían dos días de trabajo, se acortó el tiempo de procesamiento a 1-2 horas en dependencia del número de muestras. Todos los eluatos tuvieron una pureza entre 1,7 y 2,0 según la relación 260/280nm y presentaron concentraciones adecuadas para la ejecución de las diferentes técnicas.

Los nuevos métodos de PCR-TR que se implementaron mostraron una correcta capacidad de amplificación con concentraciones iniciales de ADN entre 5 y 100 ng/μL, a diferencia de los anteriores como la PCR-SPP y la PCR-RFLP que necesitaban entre 50 y 500 ng/μL, lo que necesariamente implicaba un mayor volumen de muestra inicial para realizar el aislamiento de ácidos nucleicos.

A partir de la detección y tipificación de micoplasmas en muestras de exudados endocervical se pudo identificar adecuadamente las especies *Ureaplasma urealiticum*, *Mycoplasma hominis* y *Mycoplasma genitalum*. El método consistió en un sistema cualitativo con sondas de hibridación y formato de detección de tres colores, empleando un control interno de la reacción. Para el análisis de los resultados se utilizaron los datos obtenidos a partir de las curvas de amplificación y las temperaturas de desnaturalización (*melting*). Durante el período de implementación se procesaron 60 muestras, identificándose 15 positivas a algunos de los citados microorganismos.

La optimización del aislamiento de ácidos nucleicos y de la puesta en funcionamiento del método basado en PCR-TR para micoplasmas sirvió de base para introducir otro método cualitativo como el genotipaje del HLA-B*27 a partir de muestras de sangre periférica, el cual permitió sustituir el PCR-SSP y complementar el diagnóstico de las espondiloartropatías. Esta prueba se basó en la utilización sondas de hibridación con formato de sonda única (*simple probe*). Durante el período de implementación se procesaron 50 muestras, de ellas 8 positivas.

De igual forma, se sustituyó mediante la PCR-TR con sondas de hibridación el PCR-RFLP en la detección de las mutaciones Factor V Leiden y Factor II G20210A y se introdujeron por primera vez en Cuba, Factor XIII A V34L, mthfr A1298C y mthfr C677T; lo que permitió mejorar el diagnóstico de los trastornos de la coagulación. La mutación G1691A del factor V se encontró en 4 pacientes de 111, la G20210A del factor II en 3 de 48 y la mthfr A1298C en 5 de 9, mientras que la mthfr C677T no se detectó en ninguno de los 9 estudiados. La determinación de la mutación A V34L del factor XIII se realizó en 9 pacientes con tendencia al sangramiento, encontrándose presente en 3 de ellos.

La genotipificación de los alelos HLA-DQB1*02, DQB1*03:02 y DQA1*05 mediante sondas Taqman y lecturas de fluorescencia en dos canales, se basó en la interpretación de las curvas de amplificación. De los 14 casos con diagnóstico presuntivo de Enfermedad celíaca no se detectó variante heterocigótica a HLA-DQB1*02 DQB1*03:02, dos muestras resultaron HLA-DQB1*02 DQA1*05, cuatro HLA-DQA1*05, nueve DQB1*02 y solo una, HLA-DQB1*03:02.

Finalmente, en el desarrollo de métodos cualitativos, se implementó un nuevo PCR-TR para la detección del genoma del virus de la hepatitis B con SyberGreen y los cebadores del método tradicional de PCR-SSP. La interpretación se basó en el análisis de las curvas de amplificación y las temperaturas de desnaturalización.

También se implementaron PCR-TR cuantitativos, como la detección y cuantificación de *Chlamidia Trachomatis*, para el que se construyó inicialmente una curva de estándar. Se emplearon sondas de hibridación y dos canales de lectura, uno de ellos para el control interno. El ensayo permitió detectar dos muestras positivas entre las 60 que se evaluaron durante el período.

Otros métodos cuantitativos permitieron identificar los reordenamientos BCR/ABL, PML/RAR α , AML1-ETOyCBFb-MYH11, mediante la cuantificación relativa de un gen de interés con respecto a un gen de referencia que se expresa constitutivamente. Para la implementación de estos diagnósticos se construyeron curvas de estándares y se emplearon sondas de hibridación que se detectaron mediante un solo canal de lectura. Se procesaron como controles muestras de ADN complementario positivos a cada reordenamiento identificados previamente mediante los métodos tradicionales y se estudiaron 19 casos remitidos por el servicio de hematología del

hospital. El reordenamiento BCR-ABL se encontró en 2 de 13 pacientes y el PML/RAR α , en 1 de 3, mientras que en los reordenamientos AML1-ETO yCBFb-MYH11 no se detectaron en ninguno de los 3 casos estudiados.

Se realizaron 14 determinaciones en muestras de tumores embebidas en parafina de los biomarcadores kras y braf, que permitieron seleccionar la terapéutica más adecuada y evaluar la respuesta al tratamiento. Se obtuvieron 2 casos positivos para braf y 4 para kras.

De forma general, la introducción de la tecnología PCR-TR permitió acortar el plazo de entrega de resultados y ampliar los estudios moleculares para abordar trastornos de la coagulación y biomarcadores para el cáncer que antes no se realizaban.

CONCLUSIONES

La implementación por primera vez en Cuba del PCR-TR en nuevas áreas de la medicina permitió revolucionar el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de patologías que hasta el momento no contaban con esta herramienta; y creó un precedente para la expansión y fortalecimiento de esta tecnología en el sistema de salud cubano.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rodriguez Lay Lde L, Montalvo Villalba MC, Sariego Frometa S, Bello Corredor M, Mora Laguna E, Kouri Cardella V, et al. Real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B virus DNA quantification. *Rev Cubana Med Top.* 2012;64(3):290-303.
2. Zhen C, Wang YL. Molecular Monitoring of Chronic Myeloid Leukemia: International Standardization of BCR-ABL1 Quantitation. *J Mol Diagn.* 2013;15(5):556-64.
3. Podnecky NL, Elrod MG, Newton BR, Dauphin LA, Shi J, Chawalchitiporn S, et al. Comparison of DNA extraction kits for detection of *Burkholderia pseudomallei* in spiked human whole blood using real-time PCR. *PloS one.* 2013;8(2):e58032.
4. Aydin H, Gunay M, Celik G, Gunay BO, Aydin UT, Karaman A. Evaluation of Factor V Leiden, Prothrombin G20210A, MTHFR C677T and MTHFR A1298C gene polymorphisms in retinopathy of prematurity in a Turkish cohort. *Ophthalmic genetics.* 2016;37(4):415-8.

5. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC, Gandolfi L, Pratesi R, Nobrega YK. Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. *Arq gastroenterol.* 2015;52(2):143-6.

