

Relevancia de la participación en un estudio de evaluación externa de calidad utilizando técnicas moleculares para la detección de virus

Sampieri, L(1); da Silva, MA(1); Rodríguez-Lombardi, G(1); Bernardi, ME(1).

(1) Área de Desarrollo de Productos y Procesos, Laboratorio de Hemoderivados
Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Contacto: lsampieri@unc.edu.ar

Durante el diseño, desarrollo, validación e implementación de una técnica molecular de tipo in-house aplicada a la detección de genomas virales, deben ser considerados ciertos criterios que garanticen la adecuada performance de la misma para el propósito planteado como ser: especificidad, límite de detección y robustez, entre otros. Un aspecto fundamental es que la técnica sea capaz de detectar todos los genotipos de importancia para el virus de interés. Para garantizar esto, es necesario realizar la selección de primers y sondas empleando herramientas bioinformáticas para el análisis in silico, confirmando posteriormente mediante ensayos in vitro. La participación en estudios de control de calidad externo resulta una herramienta indispensable para evaluar y monitorear la performance de los métodos analíticos, permitiendo, entre otras cosas, implementar mejoras y evitar la subdetección de variantes genotípicas. En nuestro laboratorio, se diseñó una técnica de transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real en un único paso ("one-step" RT-qPCR) con sondas de hidrólisis para la detección del ARN del virus de la hepatitis C (VHC) en plasma humano. Los primers y sondas empleados fueron diseñados dentro de la región 5' NC para lograr la detección de los principales genotipos y subtipos descriptos hasta el momento. El objetivo planteado fue evaluar la performance de cobertura de los genotipos del VHC de la técnica desarrollada mediante la participación en un programa de evaluación externa de la calidad organizado por QCMD (Quality Control for Molecular Diagnostics). Se analizó un panel compuesto por muestras de plasma reactivas (genotipos 1a, 1b, 3a y 4a) y no reactivas para el VHC remitido por QCMD, en paralelo con estándares internacionales del VHC (NIBSC) mediante la técnica de RT-qPCR. Los resultados fueron evaluados mediante el análisis de las curvas de amplificación y la detección de los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa. De acuerdo con los resultados obtenidos, la técnica de RT-qPCR fue capaz de detectar los genotipos 1a, 1b y 4a, mientras que tuvo limitaciones para detectar el genotipo 3a. Las muestras correspondientes a éste genotipo sí fueron detectadas por electroforesis, evidenciando un problema de diseño de la sonda de hidrólisis por un fenómeno de "mispriming" (confirmado por el análisis in silico). En base a los resultados obtenidos, se modificó el diseño de la sonda para garantizar la detección de todos los genotipos de VHC. Nuestra experiencia demuestra que la participación en estudios de control de calidad externo es una herramienta objetiva y valiosa para evaluar la performance de una técnica molecular y respaldar los análisis bioinformáticos empleados para el diseño de los primers y

sondas y, como consecuencia, implementar mejoras continuas. Los métodos de detección como la electroforesis tienen mucha utilidad como soporte y complemento de la qPCR.