

# Las pruebas de diagnóstico molecular: conceptos complicados con palabras sencillas

## La biología molecular y su aplicación en diagnóstico: el diagnóstico molecular

Perdonen mi atrevimiento pero seguramente muchos de Uds tendrán una considerable "empanada mental" sobre algunos conceptos como "biología molecular", "diagnóstico molecular", "secuenciación del ADN", "carga viral", "virus de ARN", "genotipo", "unidades internacionales o copias", "western-blot", "PCR", "logaritmo", "sensibilidad", etc. No quiero ser desalentador, pero debo decir que algunos de estos conceptos no son fáciles de entender ni siquiera para los profesionales. Por ello, creo que es conveniente que hagamos un esfuerzo para explicarlos con palabras sencillas.

La biología molecular es una disciplina que estudia la organización molecular de los seres vivos, y en particular, la organización molecular de su material genético. Esta formada por un conjunto de técnicas aplicables en campos tan diversos como la biomedicina, alimentación, ecología, antropología, etc. A diferencia de otras disciplinas (como por ejemplo la microbiología) la biología molecular no se define por los organismos que estudia, sino por la forma y técnicas utilizadas para su estudio. Éstas son aplicadas tanto a la detección de virus como al estudio de mutaciones en el ADN humano, las pruebas de paternidad, criminología, etc.

## ¿Dónde está el microscopio?

Es una pregunta tan habitual cuando alguien visita un laboratorio de biología molecular que ya casi es motivo de broma. Los virus son agentes tan pequeños que no pueden observarse con un microscopio óptico. Se pueden obtener imágenes con equipos de microscopía electrónica, pero ni siquiera así muchos de los virus conocidos se han conseguido ver nunca. En cualquier caso, la microscopía no es una técnica de aplicación para la detección o la cuantificación de los virus, aunque sí lo es para el estudio de las bacterias y los hongos.



Termociclador

En los laboratorios de biología molecular utilizamos otro tipo de equipos que son nuestros "microscopios": los termocicladores. Detrás de este nombre que evoca

alguna película de ciencia ficción, se esconde una tecnología que ha permitido detectar cantidades ínfimas de agentes víricos, secuenciar el genoma humano y un sinfín de aplicaciones. En el termociclador se realiza la reacción estrella de la biología molecular: la PCR o reacción en cadena de la polimerasa.

## Los anticuerpos contra VHC: las huellas del lobo

La primera prueba que suele realizarse para la detección de la infección es el popular "ELISA" o "EIA". No es el nombre de su inventora, en inglés significa algo así como "ensayo de absorción de un anticuerpo unido a un enzima". Tal vez por hacer la gracia de llamarlo ELISA hubo que forzar algunos aspectos gramaticales.

El ELISA es un ensayo que permite detectar anticuerpos contra un sólo componente del virus, habitualmente una proteína estructural que forma parte de la cápside vírica. Es una prueba serológica de "baja especificidad" es decir que puede ofrecer falsos resultados positivos o negativos. Los falsos positivos se suelen producir porque en ocasiones el sistema inmune puede generar anticuerpos muy parecidos a los que se generan con la hepatitis C, sin serlo realmente. Cuando eso pasa, el test puede confundir por ejemplo un anticuerpo contra el pólen con un anticuerpo contra el virus. Por contra, los falsos negativos se generan cuando el sistema inmune no ha generado el anticuerpo concreto que detecta el ELISA, aunque el virus está presente y nuestro organismo haya generado otros anticuerpos contra el virus.

Esto no quiere decir que esta prueba sea mala, sino todo lo contrario. Es una técnica que debido a su bajo coste permite realizar cribados masivos en la población y ha contribuido a detectar a muchísimos enfermos. Lo que debe quedar claro es que un resultado obtenido en un ELISA necesita confirmación. El ELISA es una prueba barata y poco específica, pero hay que ir de menos a más. De menos sensible a más sensible y también de menos caro a más caro.

La prueba de confirmación por excelencia es el "western-blot" o una variante más moderna, llamada "immunoblot", también denominado RIBA. El immunoblot se puede entender como una prueba que incluye a varios ELISA a la vez. De esta forma es más difícil que se produzca un falso resultado positivo o

negativo ya que la reacción detecta varios anticuerpos simultáneamente. Casi con toda seguridad se puede decir que un western-blot positivo corresponde con un portador (seropositivo) y viceversa.

Sin embargo estas pruebas indican presencia o ausencia de anticuerpos, pero no constituyen una detección directa del virus, y por tanto no son una prueba de que haya una infección actual. Un individuo que haya eliminado la infección o un neonato cuya madre sea portadora del virus pueden ser seropositivos sin ser portadores del virus, y por tanto nunca van a desarrollar la infección. Los anticuerpos son las huellas del lobo, si hay huellas puede haber lobo, pero también puede que ya no haya lobo, simplemente pasó por allí.

Para determinar la infección con toda seguridad hay que entrar en el campo de la biología molecular, es decir volvemos a ir de menos a más: más sensible, más cara, aunque ya veremos que ni tan sensible ni tan cara como dicen.

## El ARN vírico: las orejas del lobo

El paso siguiente a las pruebas serológicas es la realización de pruebas de biología molecular. Existen dos importantes pruebas dentro de esta disciplina que aportan datos claves sobre la infección:

- 1) La detección y / o cuantificación del ARN vírico
- 2) La determinación del genotipo vírico

El material genético del VHC está constituido por ácido ribonucleico o ARN (muy parecido a su hermano el ADN). El ARN vírico forma parte del propio virus y por tanto su presencia indica la presencia de éste. Es como verle las orejas al lobo: si hay orejas hay lobo, si hay ARN hay virus. Al contrario de lo que pasa con los anticuerpos, el ARN no se detecta de forma residual después de que el virus se ha eliminado: si se detecta el ARN vírico hay virus, y por tanto estamos amenazados.



Un tema distinto es el significado de la presencia del virus, ya que no siempre tiene por qué desencadenar la enfermedad de forma inminente.

La razón por la que se ha elegido este componente para la detección del virus es técnica: detectar ARN o ADN en una muestra es mucho más sensible que detectar otro tipo de componentes del virus. Esto es posible gracias a las técnicas de biología molecular, y como ya he indicado a nuestro microscopio, el termociclador. Este equipo permite realizar la reacción de PCR, que en esencia consiste en multiplicar la cantidad de ARN vírico que se encuentra en la muestra clínica, de forma que puede ser detectado por algunos equipos de laboratorio que de otra forma no hubieran

podido detectarlo. El termociclador es la lente que amplifica el virus, pero luego tiene que haber un ojo que lo vea y ese papel lo ocupan otros equipos y otras reacciones en el laboratorio. En realidad esto es una ultra-simplificación de un proceso técnicamente muy complejo.



La detección y la cuantificación del virus tienen muchos aspectos técnicos en común, hasta el punto que algunos equipos la realizan simultáneamente. Está claro que si algo puede cuantificarse es porque también es detectable. La diferencia es que mientras una prueba sólo informa de la presencia o ausencia del virus, la otra informa de cuánto virus hay, y esto es sumamente importante.

## La carga viral

La cuantificación del virus o "carga viral" es la cantidad de virus que hay en la sangre de un portador. La carga viral se expresa en cantidad de virus por mililitro de suero o plasma. La forma de expresar la carga viral debería ser un aspecto sin importancia, pero en realidad es el comienzo de algunos líos. Inicialmente se expresaba como "número de copias", un concepto fácil de entender ya que corresponde exactamente con el número de virus. Dado que una parte de los virus que hay en una muestra no son posibles de detectar y que había diferentes técnicas que daban diferentes resultados alguien pensó que había que poner algo de orden en la forma de expresar la carga viral.

Se consideró adecuado preparar muestras conocidas y bien testadas por varios métodos a las que se les atribuyó un valor arbitrario, en unas unidades denominadas Unidades Internacionales (UI). Se puede pensar que debería haber una equivalencia clara entre copias y unidades internacionales de VHC pero no es así. Si no me creen hagan la prueba: pregúntenle a su médico o a su laboratorio que les indique exactamente a cuántas copias corresponde un valor en unidades internacionales. Pocos o nadie sabrán decirle la equivalencia, a lo sumo una aproximación. Si algún laboratorio se toma la molestia de hacer el cálculo, puede encontrar que se encuentra en torno a 4 copias por 1 UI para el VHC (VIH y VHB tienen una equivalencia distinta). Si tienen resultados expresados en distintas unidades pueden hacer una aproximación utilizando esos valores. No se crean que esta controversia es cosa de unos cuantos poco informados, ha llegado a la propia Organización Mundial de la Salud, quien por cierto tampoco se atreve a dar un valor exacto.



Una idea que no quería dejar pasar es la de la gran variabilidad existente entre diferentes resultados de la

carga viral, ya que esto suele generar bastante inquietud en los pacientes. Valorar la carga viral no es lo mismo que valorar un resultado de transaminasas. En el caso de la carga viral, lo importante es conocer cual es su tendencia, es decir si está subiendo (mala noticia) o bajando (buena noticia). Lo que de verdad importa es distinguir cuando un resultado es significativo, y para ello le recomiendo que esto se lo indique un profesional. Si hace 6 meses usted tenía una carga viral de 10.000 UI / mL y en el último resultado le han dado 12.000 UI / mL: no se preocupe, usted no está peor ni mejor que hace 6 meses. Otra cosa sería que le dieran 200.000 UI / mL, en este caso se puede considerar que está aumentando. De hecho el criterio que se suele utilizar para valorar la disminución o el aumento de la carga viral es el "logaritmo", es decir, el número de cifras. Por ejemplo, un resultado de 18.000 UI / mL es de logaritmo 4, mientras que un resultado de 450.000 UI / mL es de logaritmo 5. Parece significativo cualquier cambio de la carga viral que haga pasar de un logaritmo a otro.

La realización de la prueba de carga viral es muy importante y debe realizarse de forma periódica para detectar precozmente las posibles variaciones. Actualmente tiene un coste muy competitivo que puede variar entre 50 y 100 euros según el laboratorio y la técnica empleada.

### Los marcianos y la carga viral

Yo siempre digo que detectar un virus en el suero de un paciente es muy parecido a apuntar con un telescopio a Marte para buscar marcianos verdes en su superficie. Cualquier pequeña vibración que experimente el telescopio es suficiente para que perdamos a un marciano de vista. Cuanto más sensible sea el telescopio, mas de cerca veremos al marciano, pero más le afectarán las vibraciones. Eso es lo que sucede con la biología molecular. Actualmente es la disciplina más sensible para detectar, cuantificar y genotipar virus, pero también es la que ofrece resultados más variables, e incluso contradictorios. Es una herramienta extremadamente sensible, pero también extremadamente delicada.

Con las cargas virales pasa algo parecido. Las pruebas de determinación de la carga viral y en general las pruebas de biología molecular tienen una considerable variabilidad. Alguien me podrá decir que la causa es que las técnicas de cuantificación son "imperfectas" pero en realidad es todo lo contrario. Son técnicas tan sensibles que una pequeña variación circunstancial (por ejemplo el técnico de laboratorio que realiza una prueba) es suficiente para que se produzcan resultados distintos. Para conocer su "carga viral" con precisión tendría que hacerse varias cuantificaciones el mismo día, y cada una daría un resultado distinto (aunque parecido). Cuando tenga que comparar dos resultados distintos de carga viral le recomiendo que se acuerde de los marcianos.

### El genotipado vírico

Parece una perogrullada pero un "genotipo" se define como un "tipo genético". No es lo mismo que un "serotipo" que es un "tipo serológico". Cuando un tipo vírico puede distinguirse mediante una prueba serológica, cada tipo se denomina serotipo. En el caso del VHC los diferentes tipos no pueden distinguirse mediante técnicas serológicas, pero sí mediante técnicas genéticas, y por esto se llaman genotipos.

Existen al menos 10 genotipos distintos, que se nombran por números desde el 1 en adelante, aunque tan sólo 6 genotipos se consideran los más importantes. Además cada genotipo presenta pequeñas variantes que son denominadas subtipos y se nombran por una letra a continuación del número. Por ejemplo, 1b quiere decir genotipo 1 subtipo b, aunque tampoco es incorrecto llamarlo únicamente genotipo 1b.



La diferencia entre unos genotipos y otros se basa en pequeñas diferencias en su secuencia de ARN. Por ello la mejor manera de determinar el genotipo vírico es secuenciar el ARN vírico y compararlo con secuencias de referencia. A nivel clínico el genotipo tiene una importancia crucial, ya que se han observado diferencias en la respuesta de algunos genotipos al tratamiento con interferón. En especial, el genotipo 1 responde peor al tratamiento, mientras que los genotipos 2 y 3 responden mejor. El genotipado vírico debe realizarse antes de iniciar el tratamiento, ya que aporta una valiosa información sobre el posible éxito y la duración estimada del mismo. Este dato es particularmente importante en el caso de un fármaco como el interferón, que puede presentar desagradables efectos secundarios que desaniman a muchos pacientes a continuar con el tratamiento y, que además tiene un coste elevado.

A diferencia de la determinación de la carga viral, el genotipado sólo es necesario realizarlo una vez. Puede realizarse con la misma muestra que se toma para las pruebas serológicas y para la cuantificación, es decir no es necesario realizar una nueva extracción de sangre, y al igual que las pruebas de carga viral, su precio ha bajado considerablemente en los últimos años (entre 60-150 euros).

Para despedirme, espero que esta información haya sido de utilidad y contribuya a aclarar estos conceptos que suenan tanto pero que desgraciadamente se explican tan poco. ■■■■■

Suerte con su lucha.

**Diego Arroyo**  
 Director de Progenie Molecular

C/ Benjamin Franklin 12. Parque tecnológico.  
 46980 Paterna (Valencia) Tel 902 910 505  
[www.progenie-molecular.com](http://www.progenie-molecular.com)