

Detección del ADN del Virus de la Hepatitis B en suero mediante PCR y la técnica DEIA

Diego Arroyo

Progenie Molecular S.L.L. Avda Benjamín Franklin 12, Parque tecnológico 46980 Paterna Valencia



Introducción

La presencia del ADN del Virus de la Hepatitis B (VHB) en suero, indica que el virus se encuentra en una fase de replicación activa, tanto en la infección aguda como en los portadores crónicos. Su detección complementa los datos serológicos del paciente y es de gran utilidad para conocer el curso de la enfermedad y establecer un diagnóstico preciso.

Los métodos basados en la PCR (*polymerase chain reaction*) son los más sensibles para la detección del ADN vírico, y por ello vienen siendo utilizados desde hace algunos años. Su sensibilidad depende del rendimiento de las tres principales etapas del método: extracción de los ácidos nucleicos de la muestra clínica, amplificación y análisis de los productos amplificados. La electroforesis en gel de agarosa es el tradicional sistema de análisis de los productos. Sin embargo, la utilización de técnicas enzimáticas de detección, basadas en la hibridación sobre diferentes soportes (filtros de nylon, etc) incrementa notablemente la sensibilidad del conjunto del método. La técnica DEIA (*DNA Enzyme Immuno Assay*) consiste en la hibridación de los productos de PCR con una sonda biotinilada, previamente anclada a un pocillo sensibilizado con avidina. La hibridación se detecta mediante la utilización de un anticuerpo primario, específico de ADN doble cadena y un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano (HRP). La visualización se realiza mediante la adición de una mezcla cromógeno-sustrato que en presencia de la peroxidasa da lugar a la aparición de un producto coloreado.

La utilización de la PCR en la rutina clínica tiene dos importantes inconvenientes: los falsos positivos debidos a las contaminaciones, y los falsos negativos debidos a las inhibiciones producidas por algunos compuestos presentes en las muestras biológicas (polisacáridos, urea, hemoglobina, anticoagulantes, etc). Para evitarlos debe utilizarse un control interno (CI) que se amplifique en todas las muestras, independientemente de la presencia o ausencia del virus. Existen varias estrategias, para la utilización de controles internos de amplificación: plásmidicos (ADN), transcritos (ARN), incluidos en la etapa de purificación de ácidos nucleicos o en la misma PCR, amplificados con los mismos oligonucleótidos que el virus o mediante oligonucleótidos específicos, etc. Cada sistema tiene ventajas e inconvenientes, y en función del uso que se le pretenda dar, puede optarse por uno u otra alternativa.

Método

Extracción del ADN vírico: se realiza mediante un sencillo método, basado en la incubación directa del suero con una solución de NaOH que lisa las proteínas de la nucleocápside, liberando el ADN vírico. Posteriormente el lisado es neutralizado en un tampón Tris-HCl para evitar la degradación del ADN en un medio básico, y facilitar la reacción de amplificación.

Amplificación mediante PCR: 5 µL de la extracción del ADN vírico es añadido directamente a una mezcla de amplificación que contiene todos los reactivos necesarios para la amplificación en el mismo tubo de un fragmento de 150 pb de la región *core* del VHB, y un producto de amplificación de 584 pb del CI. El resultado de las amplificaciones puede ser analizado previamente en un gel de agarosa/bromuro de etidio, y posteriormente mediante la técnica DEIA (figura 1).

Análisis de los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa: se toma 1 alícuota de 10 µL del producto de amplificación (volumen total 50 µL) y es analizado en un gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Análisis de los productos de amplificación mediante la técnica DEIA: se toman 2 alícuotas de 20 µL del producto de amplificación. Uno de las alícuotas se añade a un pocillo de la placa de DEIA, previamente preparado con la sonda específica del VHB. El otro se añade a un pocillo previamente preparado con la sonda del CI. La hibridación se detecta como se indica en la figura 2.

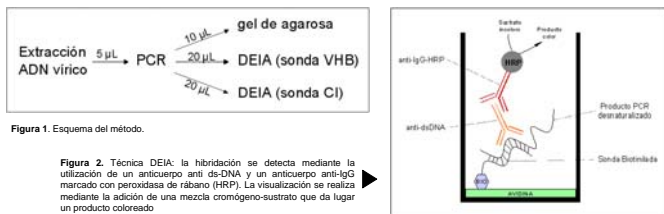


Figura 1. Esquema del método.

Figura 2. Técnica DEIA: la hibridación se detecta mediante la utilización de un anticuerpo anti ds-DNA y un anticuerpo anti-IgG marcado con peroxidasa de rábano (HRP). La visualización se realiza mediante la adición de una mezcla cromógeno-sustrato que da lugar a un producto coloreado

Resultados

Valoración del método de extracción

Se comparó el rendimiento del presente método de extracción de ADN, respecto al de un método comercial basado en columnas de afinidad. Se procesó una serie de 44 muestras caracterizadas serológicamente, utilizando ambos sistemas de extracción. Las 2 series de ADN obtenidos fueron amplificadas mediante el mismo protocolo de PCR y analizadas en un gel de agarosa, obteniéndose el mismo resultado: 13 positivos y 21 negativos. En ensayos de sensibilidad se obtuvieron valores similares entre ambos sistemas.

Análisis de las secuencias de diferentes subtipos de VHB

Se realizó un alineamiento de las secuencias de la región *core* de los subtipos más frecuentes: *adr*, *ayr*, *ayw* y *adw*. El resultado se muestra en la figura 3. A partir de secuencias conservadas se diseñaron los oligonucleótidos HB1 y HB2 utilizados para la PCR, y el oligonucleótido Bio-HBS1 utilizado como sonda de hibridación (fig 3).

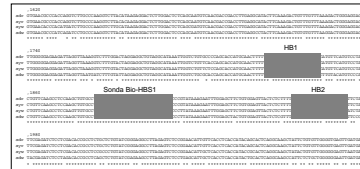


Figura 3. Alineamiento de la región core de subtipos de VHB

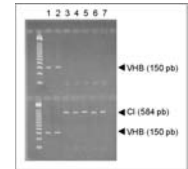


Figura 4. Análisis electroforético de los productos de amplificación de muestras positivas (carriles 1 y 2) y negativas (carriles 3,4,5,6 y 7). Arriba: sin CI. Abajo: con CI.

Control interno de amplificación

Se diseñó una construcción artificial de ADN, a partir de un fragmento de genoma humano insertado en la región *core* de VHB. Ésta sirve de molde a los oligonucleótidos HB1 y HB2, pero genera un producto de amplificación de distinto tamaño y secuencia al producto específico del virus. Se utilizó el CI como un componente más en la mezcla de amplificación.

Amplificación del VHB y del CI

Se co-amplificaron en el mismo tubo los fragmentos del VHB (150 pb) y del CI (584 pb). El producto de 584 pb del CI debe aparecer en todas las reacciones, correspondan o no a portadores del virus. Las muestras positivas presentan la banda de 150 pb del VHB, y la banda de 584 pb del CI. Las muestras negativas presentan sólo la banda de 584 pb del CI (figura 4). Los falsos negativos pueden detectarse ya que no presentan la banda del CI.

Se observó un fenómeno de competición por los recursos de la reacción, entre el CI y el VHB. Se realizaron ensayos para evitar que este efecto disminuyera la sensibilidad de la detección de VHB. Se ajustó la concentración del CI hasta el mínimo detectable, de forma que los resultados con/sin CI resultaron idénticos. Debido a ello, las muestras portadoras de una elevada carga viral a menudo sólo presentan la banda de 150 pb del VHB, ya que la amplificación del fragmento vírico consume la mayor parte de los reactivos, impidiendo la amplificación del CI (figuras 4 y 5).

Análisis electroforético de los productos de amplificación

La sensibilidad obtenida mediante el análisis electroforético en ensayos de dilución límite de sueros con carga viral conocida se sitúa entre 10.000-100.000 copias VHB/mL suero (figura 5).

Análisis de los productos de amplificación mediante DEIA

Para cada muestra o control se obtienen 2 lecturas de absorbancia, una correspondiente al producto de VHB y otra al producto del CI. La figura muestra un ejemplo de los posibles resultados que se pueden obtener en una serie. Se obtuvo una sensibilidad de 1000 copias de VHB/mL mediante ensayos de dilución límite.

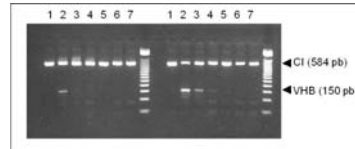


Figura 5. Análisis electroforético de 2 diluciones seriadas de VHB. Carriles: 1) control negativo; 2) 10 pg/mL; 3) 1 pg/mL; 4) 100.000 copias/mL; 5) 10.000 c/mL; 6) 1.000 c/mL; 7) 100 c/mL. Izquierda: dilución 1:100.000 del CI; Derecha: dilución 1:10.000 del CI.



Figura 6. Ejemplo de resultados de la detección de VHB y del CI en una placa de DEIA

Referencias

Escarceller M, Rodríguez-Frías F, Jardí R, San Segundo B y Eritja R. Detection of hepatitis B virus in human serum samples: use of digoxigenin-labeled oligonucleotides as modified primers for the polymerase chain reaction. *Anal Biochem.* 1992; 206: 36-42.
 Mantero G, Zonaro A, Albertini A, Bertolo P, Primi D. DNA enzyme immunoassay: general method for detecting products of polymerase chain reaction. *Clin Chem.* 1991 Mar;37(3):422-9.

Conclusiones

- El sistema de extracción de ADN presentado ha ofrecido un resultado comparable al de un método comercial basado en columnas.
- Los oligonucleótidos y la sonda utilizada se han diseñado en regiones conservadas del genoma vírico, de forma que se garantiza el mismo nivel de sensibilidad independientemente del subtipo vírico.
- La utilización de un CI previene los falsos resultados negativos.
- La detección de los productos de amplificación mediante la técnica DEIA permite obtener una sensibilidad superior en un orden de magnitud a la obtenida mediante el análisis electroforético (1000 c/mL).
- Dada la elevada carga viral de los individuos portadores, que a menudo supera los 100.000.000 copias VHB / mL, el método presentado ofrece una alternativa válida para la detección de VHB en muestras clínicas.