

DETECCIÓ DEL DNA DE VIRUS DE LA HEPATITIS B PER
REACCIÓ EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR):
COMPARACIÓ AMB LA HIBRIDACIÓ MOLECULAR.

F.X.López-Labrador, J.Costa, J.M.Sanchez-Tapias,
J.Vidal, M.T.Jimenez de Anta i J.Rodés.
Serveis d'Hepatologia i Microbiologia,
Hospital Clínic i Provincial de Barcelona.

RESUM

S'ha avaluat la detecció del DNA del virus de la hepatitis B (DNA-VHB) en 80 pacients amb hepatitis crònica causada per aquest agent mitjançant dues tècniques: hibridació molecular "dot-blot" utilitzant una sonda marcada amb ^{32}P i reacció en cadena de la polimerasa seguit de tinció amb bromur d'etidi (PCR-EB). Els resultats obtinguts per PCR concorden totalment amb els obtinguts per dot-blot. També es va estudiar la sensibilitat d'ambdues tècniques, resultant ser de l'ordre de 0,1 pg de DNA-VHB clonat pel dot-blot i de 0,01 pg per la PCR-EB. Aquests resultats indiquen que el mètode PCR-EB és adequat per a la detecció del DNA-VHB en sèrum. La PCR-EB és un procediment més senzill, ràpid i sensible que el dot-blot. Ademés te l'avantatge de que no cal la utilització d'isòtops radioactius.

INTRODUCCIÓ

L'avaluació de l'activitat replicativa del VHB a la hepatitis crònica ocasionada per aquest agent infecciós és molt important pel seguiment dels pacients, però sobretot pel control del tractament amb fàrmacs antivirals. Fins ara, el mètode més utilitzat per detectar la replicació del VHB ha estat la identificació de seqüències del seu genoma en mostres de sèrum per hibridació molecular. Aquesta tècnica és complicada i lenta de realitzar, per això la seva utilització queda restringida a un petit nombre de centres que disposen de la tecnologia i infraestructura adient. D'ençà de l'aparició de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) s'han obert noves perspectives per a la detecció d'agents infecciosos. En aquest estudi es compara un mètode d'hibridació molecular "dot-blot" amb sonda radioactiva marcada amb ^{32}P amb un procediment de PCR ràpid i senzill.

MATERIALS I MÈTODES

S'ha investigat la presència de DNA-VHB en 80 mostres de sèrum, 35 HBeAg+/Anti-HBeAg-, 39 HBeAg-/Anti-HBeAg+, 5 amb ambdós marcadors positius i 1 amb ambdós marcadors negatius.

Per a l'hibridació molecular s'ha utilitzat una modificació del mètode de Scotto et al. (1), i per a la PCR s'ha seguit el mètode de Kaneko et el. (2,3). Breument, el mètode consta d'una extracció simple del DNA-VHB tractant el sèrum amb NaOH durant

1 hora a 37°C, neutralització amb HCl i amplificació del DNA extret. Per a l'amplificació s'utilitzen "primers" corresponents a la regió Pre-C-C del genoma del VHB, una de les més conservades. La reacció es realitza en un termociclador Perkin-Elmer i consta de 30 cicles d'amplificació (1m 30s a 94°C, 1m 30s a 42°C i 3m a 72°C); els productes de la reacció es visualitzen mitjançant una electroforesi en gel d'agarosa al 2% tenyit amb bromur d'etidi (PCR-EB), detectant-se el producte amplificat com una banda de 270 pb.

La sensibilitat dels dos mètodes s'ha determinat utilitzant diferents dil.lucions de DNA-VHB clonat.

RESULTATS

Es va observar una correspondència total dels resultats obtinguts per dot-blot i per PCR-EB, excepte un cas, en el qual el dot-blot era dubtós i la PCR-EB clarament positiva.

	DOT-BLOT		PCR-EB	
	+	-	+	-
HBeAg+/Anti-HBeAg-	31	4	31	4
HBeAg-/Anti-HBeAg+	1	38	1	38
HBeAg+/Anti-HBeAg+	1	4	1	4
HBeAg-/Anti-HBeAg-	1 (d)	-	1	-

En quant a la sensibilitat, amb el mètode de dot-blot es va detectar 0,4 pg de DNA-VHB clonat a les 24 hores d'autoradiografia i 0,1 pg a les 92 hores, en canvi per PCR-EB es va detectar fins 0,01 pg de DNA-VHB clonat.

DISCUSSIÓ

Els mètodes d'hibridació molecular han estat ampliament utilitzats per a la determinació de l'activitat replicativa del VHB. No obstant, aquest procediment dura aproximadament una setmana, és complexe i, normalment, inclou la manipulació d'isòtops radioactius, la qual cosa obliga a disposar de instal·lacions adequades. Si bé als darrers anys s'han introduït mètodes de detecció amb sondes no isotòpiques, aquests no sempre proporcionen resultats satisfactoris, especialment en quant a la sensibilitat, que normalment només arriba a 1 pg de DNA-VHB clonat.

El mètode de detecció de DNA-VHB per PCR-EB utilitzat en aquest estudi presenta avantatges importants respecte a la hibridació molecular, ja que és un mètode senzill: no

s'utilitzen extraccions de DNA amb Proteïnasa K/fenol/cloroform, ni isòtops radioactius en el procés de detecció, cosa que permet el seu ús a laboratoris que no disposin de la infraestructura adequada per la manipulació de radioisòtops. Ademés, és un mètode ràpid: tot el procediment, des de l'extracció del DNA fins la detecció del producte amplificat es realitza entre 6 i 7 hores, quan l'hibridació molecular té una durada aproximada d'una setmana.

Es important destacar que el mètode de detecció del DNA del VHB per PCR-EB és equivalent al dot-blot, ja que s'ha observat una concordança total amb els resultats d'aquest mètode, i, fins i tot, més sensible, ja que per PCR-EB s'arriben a detectar 0,01 pg de DNA-VHB clonat, mentre que la hibridació molecular presenta el màxim de sensibilitat en 0,1 pg.

Degut a la major sensibilitat de la PCR-EB, aquest mètode pot ser potencialment més adequat que el dot-blot per avaluar l'activitat replicativa del VHB en pacients que presentin baixos nivells de virèmia, com, per exemple, a la fase prèvia a la seroconversió o en portadors de HBsAg, i Anti-HBeAg+, amb transaminases elevades.

Es pot concloure, doncs, que la detecció del DNA del VHB per PCR-EB és un mètode ràpid, senzill i sensible que comporta diverses avantatges importants sobre l'ús de la hibridació molecular.

BIBLIOGRAFIA

1. Scotto, J., Hadchouel, M., Hery, C., Yvart, J., Tiolais, P., Brechot, C. "Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a single spot hybridization technique: comparison with results of other viral markers." *Hepatology*, 3: 279-284 (1983).
2. Kaneko, S., Miller, R.H., Feinstone, S.M., Unoura, M., Kobayashi, K., Hattori, N., Purcell, R.H. "Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay" *PNAS*, 86: 312-316 (1989).
3. Kaneko, S., Miller, R.M., Di Bisceglie, A.M., Feinstone, S.M., Hoofnagle, J.H., Purcell, R.H. "Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase chain reaction: application for clinical diagnosis." *Gastroenterology*, 99: 799-804 (1990)