

MUTANTES DE LA REGION PRECORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN ESPAÑA: SECUENCIACION MEDIANTE P.C.R LINEAL FLUORESCENTE.

Francisco Rodriguez-Frias, Maria Buti, Jose Antonio Arranz, Montserrat Cotrina, Rafael Esteban, Rosendo Jardi, Jaime Guardia.

Departamentos de Bioquímica y Hepatología, Hospital General Universitario Vall d'Hebron, Pº Vall d'Hebron, Barcelona.

Introducción

Múltiples estudios han descrito variantes del virus de la hepatitis B con mutaciones en la región precore que impiden la expresión de la proteína HBeAg, marcador clásico de replicación viral.

Pacientes

Para estudiar la presencia de estas mutaciones en España se analizaron muestras séricas de 25 hepatitis crónicas B (5 positivas para HBeAg y 20 positivas para su anticuerpo Anti-HBe o sea sin expresión de HBeAg), todas ellas mostraban la presencia de DNA del virus (DNA-VHB positivas) y patrones histológicos de lesión hepática.

Métodos

Se amplificó la totalidad de la región precore-core del DNA-VHB, produciéndose un fragmento de 774 pb. Este fragmento fué secuenciado directamente mediante un segundo proceso de amplificación con un único cebador interno marcado con fluoresceína en su extremo 5' y en presencia de las mezclas de terminación dNTP/ddNTP, este proceso produce una amplificación lineal del ADN molde por ello se le ha denominado PCR lineal o también secuenciación cíclica (proceso Sanger repetido cíclicamente en un termoincubador).

Resultados

En un paciente HBeAg positivo y en todos los anti-HBe positivos se detectó la presencia de variantes precore: en 19 casos la sustitución G→A en la posición 1896 (que produce un codon Stop TGG→TAG), sola o acompañada de la sustitución G→A en la posición 1899; en 2 casos se detectó la sustitución C→T en la posición 1817 (que también produce un codon Stop CAA→TAA) uno de los cuales presentó simultáneamente la mutación 1896 o sea dos codon Stop. En el paciente HBeAg positivo la mutación observada fue la sustitución G→A en la posición 1899 que no produce un codon Stop. En un paciente con múltiples episodios de hepatitis aguda se secuenciaron muestras consecutivas; en la muestra inicial se observó la presencia simultánea de la forma salvaje del DNA y una variante (la 1817), en cambio una muestra de 4 años más tarde mostró la presencia de tan sólo la forma mutada coincidiendo con un episodio de elevación de ALT, asociándose la eliminación de la forma salvaje con la reactivación de la enfermedad hepática.

Conclusiones

1. Los resultados indican que la causa principal de no expresión del HBeAg en nuestro ámbito es la sustitución G→A en el nucleótido 1896, aunque también se ha detectado otra causa minoritaria en la sustitución C→T en la posición 1817.
2. La secuenciación cíclica mediante PCR lineal fluorescente se ha mostrado como un método rápido y sensible para estudiar la heterogeneidad de la región precore del virus de la hepatitis B.