

# DetECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL GENOMA DEL VIRUS DE HEPATITIS B MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Carlos Lugo<sup>1</sup>, Melisa Colmenares<sup>2</sup>, Luisa Barboza<sup>2</sup>, Henry Montes<sup>3</sup>,  
Siham Salmen<sup>2</sup>, Lisbeth Berrueta<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Asociación Científica Universitaria de Estudiantes de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela; <sup>2</sup>Instituto de Inmunología Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela; <sup>3</sup>Centro Ambulatorio de Medicina Integral, Universidad de Los Andes, CAMIULA, Mérida, Venezuela

Recibido Marzo 28, 2008. Aceptado Abril 2, 2008

## DETECTION AND QUANTITATION OF THE HEPATITIS B VIRUS GENOME BY MEANS OF REAL-TIME PCR

### Resumen

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) representa un problema de salud pública mundial. La detección y cuantificación del genoma del VHB mediante técnicas de biología molecular convencionales, representa una limitante debido a la baja sensibilidad, riesgo de contaminación y tiempo de procesamiento. En este estudio se implementó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real, basado en la detección de amplicones mediante un agente fluorescente intercalante del ADN: el SYBR-Green, a fin de detectar y cuantificar la carga viral en pacientes con el VHB mediante la técnica de PCR en tiempo real-SYBR-Green. Se incluyeron 22 individuos con infección crónica por el VHB (IC), 11 individuos curados espontáneamente (IN) y 4 controles seronegativos (C). El ADN del suero fue extraído mediante columnas de sílica. El genoma viral fue amplificado utilizando cebadores de secuencias conservadas del *core* viral y una mezcla de reacción que incluye todo para la amplificación y detección de los amplicones. Se utilizaron, además, patrones con concentración de ADN viral conocida. Finalmente, la especificidad de la amplificación fue analizada mediante una curva de fusión (*melting curve*). Se evidenció que de 22 pacientes IC, 17 resultaron positivos (77,2%). No se encontró ADN viral en CE ni en controles. El promedio de copias de ADN fue de 470.693 copias/ml, correlacionándose positivamente con el estadio clínico de la enfermedad ( $r=0,48$ ,  $p<0,05$ ). Por lo que se concluye que el PCR en tiempo real basado en agentes intercalantes es rápido, sensible y específico, siendo útil para diagnóstico y seguimiento clínico de pacientes infectados por VHB.

**PALABRAS CLAVE:** VHB, PCR en tiempo real, SYBR-Green, carga viral

### Abstract

*Hepatitis B infection represents a worldwide public health problem. The detection and quantification of hepatitis B virus (HBV) DNA through conventional molecular biology techniques has become a limitation procedure because its low sensitivity, lack of standardization, contamination risk and time consuming processing. In this study, we make use of SYBR-Green real-time polymerase chain reaction (PCR) assay to provide accurate detection and quantification of DNA from HBV. By using this technique, 22 samples from chronic infected patients (CI), 11 samples from natural immune individuals (NI) and 4 seronegative controls (C), were tested. HBV DNA extraction from serum samples was achieved by using silica columns and viral DNA was amplified by using oligonucleotide primers from a conserved viral core region and a reaction mix which includes the requirements for amplicons detection and quantitation. The quantitation was performed by using standard commercially available panels of HBV DNA. Finally, a melting curve analysis was performed to assure the specificity of the PCR product. Our study shows that 17 of 22 CI patients were positive for HBV DNA (77.2%); no HBV DNA was detected either in NI or in C individuals. The mean value of viral load was 470.693 copies/ml which correlated with the clinical status of the patients ( $r=0.48$ ;  $p<0.05$ ). We conclude that SYBR-Green real-time PCR could be easily and reliably applicable, avoiding the use of laborious and time-consuming electrophoresis techniques during the detection steps, representing a powerful diagnosis tool for monitoring HBV infection.*

**KEY WORDS:** HBV, real-time PCR, SYBR-Green, viral load

## Introducción

La hepatitis B es una enfermedad hepática causada por el virus de la hepatitis B (VHB); la Organización Mundial de la Salud estima que existen dos millones de personas infectadas, de las cuales 350 millones son portadores crónicos del antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y estos individuos tienen un alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (1). El VHB, agente causal de esta enfermedad, es transmitido a través de la exposición percutánea o permucosa a fluidos corporales infecciosos, del contacto sexual con la persona infectada y por vía perinatal de la madre infectada a su hijo (2). La frecuencia de la infección por este virus y los patrones de transmisión varían marcadamente en diferentes partes del mundo. Aproximadamente 45% de la población mundial vive en áreas donde la prevalencia de la infección crónica es alta (más del 8% de la población es positiva para el HBsAg), 43% vive en áreas donde la prevalencia es moderada o intermedia (2 a 7% de la población es HBsAg positiva) y 12% vive en áreas de baja endemicidad (entre 0 y 2% de la población es HBsAg positiva) (3). En Sudamérica ocurren anualmente más de cien mil casos de infección aguda, con nivel de exposición que oscila entre 6,7 y 41% y una prevalencia del HBsAg que varía entre 0,4 y 13%. Venezuela presenta un nivel de prevalencia intermedia (1-5%), con focos de alta endemicidad: Amerindios del Amazonas en el Estado Delta Amacuro, Sierra de Perijá en el Estado Zulia y un foco descrito en el Estado Barinas (4-7)..

La hepatitis B es una enfermedad necroinflamatoria de severidad variable. Las consecuencias de la infección aguda son muy inestables. El período de incubación puede extenderse desde seis semanas a seis meses y el desarrollo de las manifestaciones clínicas es altamente dependiente de la edad (8). La infección crónica se define como la presencia de HBsAg en el suero durante al menos seis meses y ausencia de anticuerpos contra el antígeno de superficie (anti-HBs). El riesgo de desarrollar la infección crónica varía inversamente con la edad y es más elevado en niños infectados durante el período perinatal. Las personas con infección crónica por el VHB tienen un riesgo elevado de desarrollar enfermedad hepática crónica, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular (9).

La infección crónica es definida por

criterios clínicos y de laboratorio determinados de la siguiente forma: a) Hepatitis crónica, establecida por la presencia del HBsAg por más de seis meses, niveles de ADN del VHB en suero por encima de 105 copias/ml, elevación persistente o intermitente de las aminotransferasas ALT/AST, biopsia hepática positiva para hepatitis crónica (estado necroinflamatorio). A su vez, puede ser subdividida en: antígeno "e" (HBeAg) positivo, anti-HBe negativo y HBeAg negativo y b) Estado de portador inactivo, delimitado a aquellos pacientes con infección persistente por el VHB en el hígado sin enfermedad necroinflamatoria importante y HBsAg positivo mayor a seis meses, HBeAg negativo, anti-HBe positivo, niveles en suero de ADN del VHB por debajo de 105 copias/ml, aminotransferasas (ALT/AST) persistentemente normales, y biopsia con ausencia de proceso inflamatorio significativo (9). Así, la infección crónica cursa con diferentes estadios establecido por: niveles de aminotransferasas, lesión hepática y carga viral, siendo la determinación de la carga viral del VHB una herramienta clave para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes crónicamente infectados.

Debido a la sensibilidad y especificidad que la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real proporciona para la detección y cuantificación de la carga viral, la cual representa una herramienta fundamental en el diagnóstico y tratamiento de los pacientes crónicamente infectados por el virus de la hepatitis B, se decidió implementar dicha técnica, usando un agente fluorescente intercalante del ADN llamado *SYBR-Green* y de esta manera contribuir con el adecuado manejo de la infección viral.

## Material y métodos

En este estudio se utilizó la PCR en tiempo real basado en la detección de amplicones mediante un agente fluorescente intercalante del ADN: el *SYBR-Green*, como herramienta para la cuantificación y clasificación de los pacientes infectados crónicos por el VHB. Se incluyeron en este trabajo, 22 individuos con infección crónica por VHB (grupo IC), 11 individuos curados espontáneamente (grupo IN) y 4 controles seronegativos (grupo C). Los individuos pertenecientes a los grupos IC e IN, fueron diagnosticados y valorados clínicamente en la consulta de gastroenterología de la Clínica

Ambulatoria de Medicina Integral de la Universidad de Los Andes (CAMIULA), y cumplieron con los siguientes requisitos de admisión para el estudio: serología positiva para el VHB y serología negativa para los siguientes virus: inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis C (VHC), citomegalovirus (CMV) y Epstein-Barr (VEB). La determinación serológica del VHB se realizó mediante ELISA (Organon Teknike, Boxtel, NL, USA). El diagnóstico de la infección por el VHC se llevó a cabo investigando la presencia de IgG contra los antígenos del *core*, NS3, NS4 y Ns5 por medio del ensayo inmunoenzimático (EIA) de IV generación (Innotest<sup>TM</sup>, Innogenetics NV). La evaluación de la infección por VIH se hizo con un EIA de IV generación y de las infecciones recientes por CMV y EBV se descartaron utilizando EIAs para IgM específica para cada virus (Organon Teknike, Boxtel, NL, USA). Como grupo control (C), se incluyeron 4 individuos sanos negativos para el VHC, VIH, VHB, CMV y VEB. Todas las personas incluidas en este trabajo fueron notificadas del propósito del estudio y dieron su consentimiento por escrito siguiendo las normas del comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes.

Para la amplificación del genoma viral mediante PCR cuantitativo *SYBR-Green*, el genoma del VHB fue amplificado a partir de muestras de suero almacenadas apropiadamente hasta el momento de la extracción del material genético. Para la extracción del ADN viral se usó el estuche de purificación de Quiagen ADN (Quiagen, Hilden, Germany), y se siguieron las instrucciones de la casa comercial; brevemente, los sueros fueron tratados con detergente, servidos en columnas de sílica, centrifugados y lavados dos veces a fin de eliminar el material no adherido a la columna, finalmente el ADN fue eluido de la columna y utilizado para la PCR en tiempo real. La amplificación se realizó empleando los iniciadores: sense 5' AGACCACCAAATGCCCTAT 3', antisense 5' GATCTTCTGCGACGCGGCGA 3' (10). La amplificación en tiempo real se llevó a cabo en un sistema detector de fluorescencia en tiempo real de cuatro colores Chromo4<sup>TM</sup> (BioRad), y una mezcla (MasterMix) que contiene los componentes de la reacción del PCR incluyendo el *SYBR-Green* (EUROGENTEC, San Diego California USA). En paralelo se utilizó un estándar de concentración conocida (ACURRUN 325, BBI

Diagnostic, Boston USA) y de esta manera establecer una curva de regresión lineal y obtener la concentración en copias/ml (Opticon3, Inc). Posterior a un paso de pre-incubación durante 15 min a fin de activar la HotStarTaq DNA polymerase, se llevaron a cabo 40 ciclos que incluyen desnaturalización (94 °C, 15s), empalme (60°C, 20 s) y extensión (72 °C, 25 s). Al finalizar la amplificación se llevó a cabo la curva de fusión que incluyó calentamiento de 72°C a 95°C y lecturas cada 0,2 °C a fin de discriminar las señales de fluorescencia inespecífica.

## Resultados y discusión

De los 22 pacientes del grupo IC, 17 resultaron positivos (77,2%). Ninguno de los del grupo C ni IN presentó niveles detectables de ADN viral, discriminados apropiadamente por la curva de fusión (Fig. 1), que logró separar a los IC de los IN. La curva de fusión de los individuos infectados crónicos se ubicó por encima de 79,9°C (región identificada como "b"), mientras que la de los controles y curados (región identificada como "a") se situó alrededor de 74°C, en estrecha cercanía de la observada para el agua (control de contaminación de la amplificación).

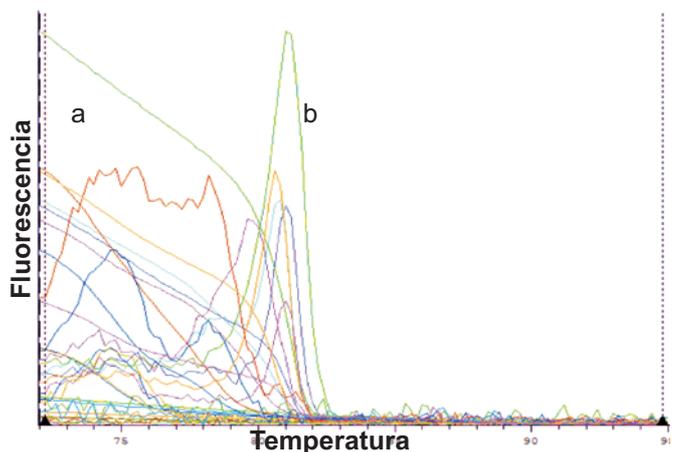


Figura 1. Curva de fusión del PCR en tiempo real SYBR-Green.

El promedio de copias fue de 470.693 copias/ml, correlacionándose positivamente con el estadio clínico de la enfermedad ( $r=0,48$ ,  $p<0,05$ ). Nueve de los individuos infectados crónicos fueron clasificados como portadores del virus y 13 considerados con infección crónica activa. En la

**Tabla 1.** Características clínicas de los sujetos estudiados

	<b>Controles</b>	<b>Inmunizados naturalmente</b>	<b>Infectados crónicamente</b>
Sujetos	5	11	22
Edad	35,4 ±5	50 ±10,8	48 ±8,5
ALT	-	18±3,3	38,8±20
GGT	-	28,4±6,9	44±17,7
HBsAb positivo	-	11 (100%)	0
HBsAg positivo	-	0	22 (100%)
HBcAb positivo	-	11 (100%)	22 (100%)
HBeAg positivo	-	0	6 (31,6%)
HBeAb positivo	-	11 (100%)	16 (68,4%)
Número de copias del ADN VHB (copias/ml)	Indetectable	Indetectable	470.693 copias/ml ±1,4 (77,2%)

**ALT**, alanin aminotransferasa; **GGT**, gamma-glutamyl-transpeptidasa; **HBsAb**, anticuerpo contra el antígeno de superficie; **HbsAg**, antígeno de superficie; **HBcAb**, anticuerpo contra el antígeno del *core*; **HBeAg**, antígeno e; **HBeAb**, anticuerpo contra el antígeno e.

Tabla 1 se describen las características de los pacientes, inmunizados naturalmente y controles reclutados en el estudio.

La PCR en tiempo real se basa en la detección y cuantificación de un producto fluorescente; esta señal aumenta directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR en una reacción. Registrando la cantidad de emisión de la fluorescencia en cada ciclo, es posible supervisar la reacción de PCR durante la fase exponencial donde el primer aumento significativo en la cantidad de producto de PCR correlaciona a la cantidad inicial de plantilla de ADN. Cuanto más alto es el número de la copia del ácido nucleico a amplificar, más pronto se observa el aumento significativo en fluorescencia (11). El uso de PCR en tiempo real *SYBR-Green* es una herramienta útil para propósitos de diagnóstico, clasificación clínica y seguimiento de pacientes infectados por VHB, que además muestra ser altamente sensible, específica y rápida. La implementación de métodos basados en la PCR han permitido mejorar la sensibilidad de detección del genoma viral, mas recientemente el uso del PCR en tiempo real ha facilitado la detección del ADN VHB obteniéndose

resultados precisos, reproducibles y sensibles (12).

Nuestro estudio demuestra que la PCR en tiempo real para la detección y cuantificación del ADN VHB, tiene valor pronóstico en la evolución de la hepatitis B crónica y puede ser utilizada para el diagnóstico y monitoreo de los pacientes IC por el VHB, evidenciado, por el hecho de que se obtuvo una concordancia del 100% entre la presencia del genoma viral en circulación con los resultados de la serología, y diferenciar a los individuos IC de los IN, además, de una correlación positiva entre la carga viral y el grado de inflamación hepática. Por lo tanto, su implementación permitirá un mejor manejo de los pacientes IC y pudiera ser aplicable en masa, para detectar el genoma viral, bien sea en regiones endémicas o simplemente para entender y evaluar la carga viral, la respuesta al tratamiento y el seguimiento a los pacientes.

#### **Agradecimientos**

Este trabajo fue financiado en parte mediante un proyecto del FONACIT identificado con el código G-2005000407 y por el CDCHT de la Universidad de los Andes código M-864-06-07-A.

**Correspondencia:** Dra. Lisbeth Berrueta, Instituto de Inmunología Clínica, Edificio Louis Pasteur, Anexo al IAHULA, Av. 16 de Septiembre, Mérida, Venezuela. e-mail: lberruet@ula.ve

## Referencias

1. Chisari, F. 2000. Viruses, immunity, and cancer: Lessons from Hepatitis B. *Am. J. Pathol.* 156:1117-1132.
2. Chang, M. 2000. Natural history of hepatitis B infection in children. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 15 (Suppl):E11-E19.
3. Mahoney, F. J. 1999. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:351-366.
4. Betancourt, A., Jaimes, E., Flores, J., Martínez, D. 1987. Análisis de resultados de hepatitis B y delta en Barinitas y La Barinesa, Estado Barinas. Informe al MSAS.
5. Goncalves, L., Barboza, L., Albarrán, B., Salmen, S., Montes, H., Hernández, M., Berrueta, L. 2006. Patrón de activación de linfocitos T en ausencia de respuesta protectora contra el virus de la hepatitis B. *Invest. Clin.* 47:83-96.
6. Torres, J. 1996. La infección por el virus de la hepatitis B y delta en Sur América. *Boletín Venezolano de Infectología* 6:68-79.
7. Torres, J., Machado, I. 1994. Special aspects of hepatitis B virus and delta virus infection in Latin America. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 38:48-55.
8. Yim, H. J., Lok, A.S. 2006. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 43(2 Suppl 1):S173-181.
9. Keeffe, E., Dieterich, D., Han, S., Jacobson, I., Martin, P., Schiff, E., Tobias, H., Wright, T. 2004. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2:87-106.
10. Barboza, L., Salmen, S., Goncalves, L., Colmenares, M., Peterson, D., Montes, H., Cartagirone, R., Gutierrez, M.D., Berrueta, L. 2007. Antigen-induced regulatory T cells in HBV chronically infected patients. *Virology* 368:41-49.
11. Schefe, J. H., Lehmann, K.E., Buschmann, I.R., Unger, T., Funke-Kaiser, H. 2006. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J. Mol. Med.* 84:901-910.
12. Mendy, M.E., Kaye, S., van der Sande, M., Rayco-Solon, P., Waight, P.A., Shipton, D., Awi, D., Snell, P., Whittle, H., McConkey, S.J. 2006. Application of real-time PCR to quantify hepatitis B virus DNA in chronic carriers in The Gambia. *Virology J.* 3:23.