

Método de reacción en cadena de la polimerasa para determinar la replicación del virus de la hepatitis B

Polymerase chain reaction method to determine replication of hepatitis B virus

María Teresa Martínez Echevarría, Suchiquil Rangel Velazquez, Gissel García Menéndez, Amarilys Martínez Piedra, Pedro E. Velbes Marquetti, Raúl Pablo Ferreira Capote

Hospital Clínicoquirúrgico "Hermandos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

RESUMEN

Objetivo: evaluar el desempeño clínico de un método de reacción en cadena de la polimerasa con modificaciones para la detección de la replicación del virus de la hepatitis B en pacientes infectados.

Métodos: se estudiaron 266 muestras de suero de pacientes provenientes de los servicios de Gastroenterología, Trasplante, Hemodiálisis y Hematología del Hospital Clínicoquirúrgico "Hermandos Ameijeiras", con el antígeno de superficie (HBsAg) positivo y altos valores de enzimas hepáticas (aspartatoaminotransferasa, aspartatoaminotransglutaminasa y gamma-glutamilttransferasa), así como 5 muestras de individuos clínicamente sanos. El ADN se extrajo mediante el método del fenol-cloroformo. Se amplificó un fragmento de la región Pre S del virus de la hepatitis B y un fragmento del gen de la β -globina como control interno de la reacción.

Resultados: El fragmento del gen de la β -globina se verificó en las 266 muestras estudiadas. La región Pre S del virus de la hepatitis B en cambio, fue detectada en 103 de ellas, siendo informadas como positivas para la replicación viral. En la muestra se obtuvo una prevalencia 98,15 % para la replicación del virus de la hepatitis B. La especificidad clínica del ensayo fue del 100 %, la sensibilidad clínica del 38 %, el valor predictivo positivo del 100 % y el valor predictivo negativo del 64 %. El análisis de concordancia no mostró acuerdo ($\kappa = 0,022$ para una $p = 0,07$) entre las enzimas hepáticas y la reacción en cadena de la polimerasa. Los ensayos de repetitividad y de reproducibilidad mostraron que los resultados son reproducibles. El mayor porcentaje de positividad se encontró en los pacientes remitidos por el Servicio de Hematología (66,7 %).

Conclusiones: el método de reacción en cadena de la polimerasa evaluado constituye una herramienta certera para el monitoreo de la replicación del virus de la hepatitis B. Contar con su implementación y aplicación en la institución que se efectuó el estudio reviste gran importancia para el sistema de salud del país.

Palabras clave: virus de la hepatitis B; método diagnóstico; reacción en cadena de la polimerasa; replicación viral.

ABSTRACT

Objective: evaluate the clinical performance of a modified polymerase chain reaction method to detect replication of the hepatitis B virus in infected patients.

Methods: a study was conducted of 266 serum samples from patients cared for at gastroenterology, transplantation, hemodialysis and hematology services of Hermanos Ameijeiras Clinical Surgical Hospital with positive surface antigen HBsAg and high liver enzyme values (aspartate aminotransferase, aspartate aminotransglutaminase and gamma-glutamyltransferase), and 5 samples from clinically healthy individuals. The DNA was extracted by the phenol-chloroform method. Amplification was performed of a fragment of the Pre S region of the hepatitis B virus and a fragment of the β -globin gene as internal control of the reaction.

Results: the β -globin gene fragment was found in the 266 samples studied. The Pre S region of the hepatitis B virus, however, was detected in 103 of them. These were reported as positive for viral replication. The sample exhibited a prevalence of 98.15 % for replication of the hepatitis B virus. Clinical specificity of the assay was 100 %, clinical sensitivity was 38 %, positive predictive value was 100 % and negative predictive value was 64 %. Concordance analysis did not reveal any agreement ($\kappa = 0.022$ for $p = 0.07$) between the liver enzymes and the polymerase chain reaction. Repeatability and reproducibility assays showed that the results are reproducible. The highest positivity percentage was found in patients referred from the Hematology Service (66.7 %).

Conclusions: the polymerase chain reaction method evaluated is an accurate tool to monitor replication of the hepatitis B virus. The possibility of its implementation and application at the institution where the study was conducted is very important for the Cuban health system.

Keywords: hepatitis B virus; diagnostic method; polymerase chain reaction; viral replication.

INTRODUCCIÓN

La hepatitis B es una infección hepática potencialmente mortal causada por el virus de la hepatitis B (VHB) y constituye un importante problema de salud a nivel mundial. Se estima que hay 240 millones de personas que padecen la infección crónica -definidas como positivas al antígeno de superficie (HBsAg) durante al menos seis meses-, y que más de 686 000 personas mueren cada año como consecuencia de la infección. Generalmente, esta infección transcurre de forma

asintomática, lo que puede ocasionar cirrosis hepática, fallo hepático y hepatocarcinoma celular en el individuo infectado. Desde 1982 se dispone de una vacuna contra el VHB con una eficacia del 95 % en la prevención de la infección.^{1,2}

Los individuos infectados reciben una terapia antiviral, que generalmente resulta eficaz en la reducción de la replicación viral y en la normalización de la función hepática. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos no eliminan completamente la infección. Es por ello que se requieren de tratamientos continuos a largo plazo para mantener la supresión viral y el control de los síntomas de la infección, pero estos se ven comprometidos por la emergencia de cepas resistentes. Por este motivo se han diseñado una gran variedad de métodos que permiten diagnosticar y monitorear el curso de la infección. De ellos, la detección directa de la partícula viral en suero es uno de los más aceptados, particularmente cuando logran cubrir todas las variantes genéticas de la partícula viral, ya que permiten detectar infecciones ocultas.^{3,4}

En Cuba, a pesar de los esfuerzos realizados para erradicar la infección, todavía se informa una baja prevalencia del HBsAg (0,6 % en donantes de sangre), que es más elevada en grupos de riesgo como los pacientes de hemodiálisis (5,9 %). Para abordar el estudio y tratamiento de estos pacientes se precisa de una serie de marcadores serológicos, bioquímicos, histológicos y sobre todo moleculares, con los cuales no contamos debido a su alto costo, especialmente los que miden la presencia del ADN viral en muestras de suero, el cual constituye un marcador útil para evaluar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en pacientes con hepatitis B crónica.⁵⁻⁷

El presente trabajo tiene el objetivo de evaluar el desempeño clínico de un método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *polimerase chain reaction*) con modificaciones para la detección de la replicación del VHB en pacientes infectados

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal en el período comprendido de 2004 a 2006, que incluyó a 266 pacientes provenientes de los servicios de Gastroenterología (213), Trasplante (14), Hemodiálisis (16) y Hematología (23) del Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras" con al menos dos HBsAg positivos y cuadro clínico de posible replicación viral, marcado fundamentalmente por valores de aspartatoaminotransferasa (ASAT), aspartatoaminotransglutaminasa (ALAT) y ganmaglutamiltransferasa (GGT) fuera de su rango normal. Se incluyeron, además, cinco muestras de individuos clínicamente sanos, que estuvieron de acuerdo con participar en el estudio, para realizar los ensayos de especificidad clínica.⁷

Extracción de ADN: A todos los individuos estudiados se les tomó una muestra de 3 mL sangre periférica en tubo seco. La extracción del ADN se realizó a partir de 200 µL del suero obtenido siguiendo el método de Lo Iacono.⁸ Brevemente, a los 200 µL de suero se le añadió igual volumen de fenol saturado con TE 1X. Tras agitación vigorosa durante 1 min, se centrifugó a 10 000 r.p.m. durante 5 min obteniéndose dos fases. La fase superior se transfirió a otro tubo al cual se le añadieron 200 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (CIA). Tras agitación vigorosa durante 1 min, se centrifugó a 10 000 r.p.m. durante 5 min obteniéndose dos fases.

La fase superior se transfirió a otro tubo, y se le añadió 0,5 del volumen de acetato de amonio 7,5 M y 2,5 volumen de etanol absoluto. Tras una incubación a -20 °C durante toda la noche, se centrifugó a 12 000 r.p.m., 4 °C durante 15 min y se separó el precipitado, el cual se lavó con etanol al 70 % centrifugando a 12 000 r.p.m., 4 °C durante 15 min. Se extrajo todo el etanol y se secó el precipitado al vacío durante 10 min. Posteriormente se resuspendió en 15 µL de H₂O libre de DNAsa y se incubó durante 20 min a 56 °C en Baño de María.

Método PCR: Se amplificaron simultáneamente, un fragmento de 614 pb de la región Pre S del VHB y un fragmento de 264 pb del gen de la β-globina, mediante el empleo de los cebadores que se describen en la [tabla 1](#).^{9,10} En la mezcla de reacción se incluyeron, además, *buffer* 1x Taq DNA Polimerasa (Promega), 0,2 µM de cada cebador, 0,4 mM de cada deoxinucleótido trifosfato (Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Promega) y 2 unidades de Taq ADN Polimerasa (Amplicon) en un volumen de reacción de 50 µL, usando 5 µL de muestra. La reacción se realizó en un termociclador MJ Research modelo Minicycler. El programa consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 50 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos se visualizaron mediante electroforesis submarina en gel de agarosa al 2 %, teñido con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta. El tamaño de los fragmentos amplificados se verificó empleando en la corrida el marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). Se consideraron positivos a la presencia de ADN del VHB aquellos casos donde, además del fragmento de 264 pb del gen de la β-globina, se obtuvo el fragmento de 614 pb de la región Pre S del VHB.

Tabla 1. Descripción de los cebadores del sistema VHB

Cebador	Secuencia	Descripción	Firma
VHB 1	5'-GGG GTC ACC ATA TTC TTG GGA-3'	Sentido	GIBCO BRL
VHB 2	5'-GTC CTA GGA ATC CTG ATG-3'	Antisentido	GIBCO BRL
BG1-1	5'-GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG-3'	Sentido	GENENCO
BG1-2	5'-TGGTCTCCTTAAACCTGTCTTG-3'	Antisentido	GENENCO

Precisión (repetitividad y reproducibilidad): Se seleccionaron cinco muestras positivas y cinco muestras negativas al azar, las cuales fueron amplificadas por triplicado en tres sesiones de trabajo diferentes por distintos investigadores.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se vertieron en una matriz de cálculo Excel.

El desempeño diagnóstico se evaluó según lo establecido en la regulación 47 del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED).¹¹ Se determinaron la sensibilidad clínica, la especificidad clínica, el valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y la prevalencia. También se hizo un análisis de concordancia entre el movimiento de las enzimas hepáticas y el PCR, mediante el cálculo del índice kappa de Cohen (k), considerándose significativos los valores de $p \leq 0,05$. Se utilizó el programa Epidat para Windows, versión 3.1.

Para la caracterización de la muestra se empleó la estadística descriptiva, utilizando las frecuencias absolutas y relativas expresadas en porcentajes por tratarse de variables cualitativas, mediante el programa SPSS para Windows, versión 20.0.

RESULTADOS

El fragmento de 614 pb de la región Pre S del VHB solo se obtuvo en 103 muestras, mientras que la presencia del fragmento de 264 pb del gen de la β -globina, utilizado como control interno, se verificó en las 266 muestras estudiadas, lo que garantizó la calidad del ensayo al confirmar con mayor certeza los resultados negativos.

Especificidad clínica: En las 5 muestras de individuos clínicamente sanos, solo se obtuvo amplificación para el gen de la β -globina y los cálculos demostraron que el método es 100% efectivo en identificar el ciclo replicativo del VHB en los individuos infectados.

Sensibilidad clínica: La eficiencia del método para detectar la replicación del VHB es del 38,72 %.

Prevalencia: En la muestra estudiada se obtuvo una prevalencia del 98,15 % para la replicación del VHB.

VPP: La probabilidad de tener la enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es positivo, es del 100 %.

VPN: La probabilidad de no tener la enfermedad si el resultado de la prueba diagnóstica es negativo es del 64%.

Análisis de concordancia: No mostró acuerdo entre las enzimas hepáticas y el PCR ya que se obtuvo una $k= 0,022$ para una $p= 0,07$.

Precisión: En las cinco muestras positivas incluidas en los ensayos de repetitividad y de reproducibilidad, se detectaron ambos fragmentos. Las muestras negativas solo mostraron el fragmento de 264 pb correspondiente al gen de la β -globina.

En las muestras de los pacientes que participaron en el estudio, se obtuvo una baja frecuencia de positividad a la replicación del VHB, en los servicios de Gastroenterología, Hemodiálisis y Trasplante, pero en el Servicio de Hematología fue relativamente alta. Estos datos se describen en la [tabla 2](#).

Tabla 2. Resultados del PCR para la determinación de la replicación del VHB en el período estudiado

Servicio clínico	No. de muestras	No. de muestras positivas	Porcentaje de positividad con respecto al servicio clínico
Gastroenterología	213	79	37,1
Hematología	23	16	66,7
Hemodiálisis	16	5	31,3
Trasplante	14	3	21,4
Total	266	103	38,6

DISCUSIÓN

El presente trabajo evalúa el desempeño clínico de un método de PCR con modificaciones para la detección de la replicación del VHB, el cual se basó en el

diseño de los cebadores informados por *Pawlotsky* y otros,⁹ con la introducción de un control interno, que emplea como diana un fragmento del gen de la β -globina, descrito por *Lema* y otros,¹⁰ que garantiza la confiabilidad de los resultados.

El ensayo de especificidad realizado mostró una especificidad clínica realmente alta (100 %) y permitió descartar reacciones cruzadas entre los cebadores del VHB y el genoma humano, y entre los cebadores del control interno y el genoma del VHB, todo lo cual garantiza la calidad del ensayo al confirmar con mayor certeza los resultados.^{7,12-14}

En cambio, la sensibilidad clínica del método, fue muy baja (38,72 %). Consideramos que este resultado pudiera explicarse debido a que las enzimas hepáticas no permiten definir adecuadamente, el estado clínico del paciente por lo que se consideran en nuestro caso un "estándar imperfecto".

Hoy sabemos que los marcadores bioquímicos se mueven con mayor frecuencia por la aparición de las complicaciones de la infección, que por la replicación de la partícula viral.¹⁴⁻¹⁶ Esto explica la baja frecuencia de positividad a la replicación del VHB obtenida en las muestras de los pacientes estudiados, a pesar de que en todos ellos había sospecha clínica de replicación viral, debido a sus niveles de ASAT, ALAT y GGT. La literatura señala que cuando no está bien definido el estado clínico del paciente es apropiado realizar un análisis de concordancia.¹⁰ El hecho de no haber encontrado acuerdo entre las enzimas hepáticas y el PCR para medir la replicación del VHB, confirma una vez más la necesidad de determinar la presencia del ADN del virus en suero sanguíneo, que los marcadores serológicos y bioquímicos para demostrar la replicación viral.^{2,4}

La alta prevalencia a la replicación del VHB encontrada en la muestra estudiada hace que el VPP sea alto también, ya que, al haber un menor número de personas sanas, disminuye el número de falsos positivos. Es decir, como un porcentaje alto de la población está afectado, un resultado positivo del PCR es concluyente. Asimismo, el VPN es moderado porque al haber un mayor número de personas enfermas, aumenta la probabilidad de obtener falsos negativos.^{12,13}

El método PCR introducido por nosotros mostró una buena precisión, ya que se reprodujo exitosamente por varios investigadores, con resultados reproducibles, lo que en parte asegura su confiabilidad.¹²

La replicación viral implica daño hepático y, por consiguiente, la aparición de las complicaciones de la infección, por lo cual se hace indispensable reevaluar el tratamiento del paciente. El objetivo principal del tratamiento es obtener la supresión viral, lo que a su vez reduce la progresión de las complicaciones hepáticas, las cuales pueden terminar en hepatocarcinoma celular, trasplante de hígado e incluso, la muerte del paciente. El éxito del tratamiento consiste en obtener una supresión viral continuada, la cual puede llegar a revertir la fibrosis y, por tanto, mejorar la calidad de vida del individuo infectado. Para establecer el éxito de la terapia antiviral debe realizarse el monitoreo sistemático y constante de la ALAT y sobre todo, de los marcadores moleculares: carga viral, genotipificación del virus y replicación viral, lo cual requiere de métodos moleculares costosos.¹⁷⁻²¹

Nuestros resultados brindaron mayor certeza en el diagnóstico y a partir de ellos se pudo realizar un mejor manejo del paciente infectado, por lo que la introducción del PCR para determinar la replicación del VHB es de gran utilidad para el monitoreo de la infección del VHB y su tratamiento, donde otras metodologías serológicas, bioquímicas e histológicas pudieran introducir falsos resultados. Es por ello que su

implementación y aplicación en el Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras" reviste gran importancia para el sistema de salud del país.

Agradecimientos

Agradecemos la colaboración de la licenciada *Madeline Blanco de Armas*, Investigadora Auxiliar del Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA), La Habana, Cuba, con quien realizamos tres estudios de control externo, empleando dos muestras a ciegas en cada uno. Los resultados fueron satisfactorios en todos los casos.

Conflicto de intereses

Los autores no declaran conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Basnayake SK, Easterbrook PJ. Wide variation in estimates of global prevalence and burden of chronic hepatitis B and C infection cited in published literature. *J Viral Hepat.* 2016 Jul;23(7):545-59. doi: 10.1111/jvh.12519. Epub 2016 Mar 30.
2. Wu B, Xiao F, Li P, Du Y, Lin J, Ming K, et al. Ultrasensitive detection of serum hepatitis B virus by coupling ultrafiltration DNA extraction with real-time PCR. *PLoS One.* 2017;12(2):e0170290.
3. Riaz MN, Faheem M, Anwar MA, Ummar-Raheel YB, Akhtar H, Tamanna K, et al. PCR-Based Molecular Diagnosis of Hepatitis Virus (HBV and HDV) in HCV Infected Patients and Their Biochemical Study. *Journal of Pathogens.* 2016;2016.
4. Hu J, Liu K. Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses.* 2017;9(3).
5. Sario-Frómata S, Bello-Corredor M, Montalvo-Villalba MC, Sánchez-Wong M, Marrero-Sánchez B. Infección oculta por el virus de la hepatitis B en pacientes hemodializados cubanos. *Rev Cubana Med Trop.* 2016;68(3):179-90.
6. Bello-Corredor M, Rodríguez-Argueta D, Montalvo-Villalba MC, Sario-Frómata S, Sánchez-Wong M. Infección oculta por el virus de la hepatitis B en hijos de madres positivas al HBsAg. *VacciMonitor.* 2016;25(1):12-8.
7. Rodríguez-Lay LA, Sario-Frómata S, Bello-Corredor M, Mora-Laguna E, Kourí-Cardellá V, Martínez-Rodríguez PA, et al. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del ADN del virus de la hepatitis B. *Rev Cubana Med Trop.* 2012;64(3):290-303.
8. Lo Iacono O MFB. Tratamiento de las hepatitis crónicas víricas. *Medicine.* 2000;8(13):686-92.

9. Pawlotsky JM, Bastie A, Hezode C, Lonjon I, Darthuy F, Remire J, et al. Routine detection and quantification of hepatitis B virus DNA in clinical laboratories: performance of three commercial assays. *Journal of Virological Methods*. 2000;85(1-2):11-21.
10. Lema CH, Segurondo D, Romero F, Dulong A, Panoso W, Garcia G, et al. Human Papillomavirus Infection among Bolivian Amazonian Women. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2001;2(2):135-41.
11. Regulación No. 47-2007. Requisitos para la evaluación del desempeño de los diagnosticadores. 2007.
12. Pyne MT, Vest L, Clement J, Lee J, Rosvall JR, Luk K, et al. Comparison of three Roche hepatitis B virus viral load assay formats. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(7):2337-42.
13. Han MS, Park Y, Nah H, Kim HS. Comparison of the QIAGEN artus HBV QS-RGQ Assay With the Roche COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Assay for Quantifying Viral DNA in Sera of Chronic Hepatitis B Patients. *Annals of Laboratory Medicine*. 2017;37(3):248-53.
14. Maimone S, Caccamo G, Squadrito G, Alibrandi A, Saffioti F. A combination of different diagnostic tools allows identification of inactive hepatitis B virus carriers at a single time point evaluation. *Liver Int*. 2017;37(3):362-8.
15. Oliveri F, Surace L, Cavallone D, Colombatto P, Ricco G, Salvati N, et al. Long term outcome of Inactive and Active, Low Viremic HBeAg negative Hepatitis B Virus infection: benign course towards HBsAg clearance. *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2017.
16. Lu H-YZ, Yueng YH, Cheung KF, Luk JM, Wang FS, Lau GKK. Intracellular levels of hepatitis B virus DNA and pregenomic RNA in peripheral blood mononuclear cells of chronically infected patients. *Journal of Viral Hepatitis*. 2009(16):104-12.
17. Snow-Lampart A, Chappell B, Myrick F, Schawalder J, Heathcote EJ, Marcellin P, et al. The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. In: Sprigler, editor. No Resistance to Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) Detected Following 192 Weeks of Treatment in Subjects with Chronic Hepatitis B Virus 2011: *Hepatol Int*. 2011. p. 3-558.
18. Liu PJC, Chen DS. The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. In: Sprigler, editor. Challenging in Chronic Viral Hepatitis: HBV-HCV Coinfection 2011. *Hepatol Int*. 2011. p. 3-558.
19. Gane E, Heathcote EJ, Sievert W, Trinh H, Kaita K, Younoss JG, et al. The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. In: Sprigler, editor. Efficacy/Safety of Tenofovir Disoproxil Fumarate (TDF) in Asians with HBeAg+/HBeAg-Negative Chronic Hepatitis B (CHB), Four Year Preliminary Analysis; 2011. *Hepatol Int* 2011. p. 3-558.
20. Gane E. The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. In: Sprigler, editor. Does Antiviral Therapy Alter the Outcome in HBV and HCV Cirrhosis?; 2011. *Hepatol Int* 2011. p. 3-558.

21. Piratvisuth T. The 21st Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. In: Sprigler, editor. Enlightening the Future: Coming Era of Individualized Treatment of Chronic Hepatitis B; 2011. Hepatol Int 2011. p. 3-558.

Recibido: 3 de mayo de 2017.

Aprobado: 19 de octubre de 2017.

María Teresa Martínez Echevarría. Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". San Lázaro No. 701 entre Belascoaín y Marqués González, Centro Habana, La Habana, Cuba. CP 10300. Correo electrónico: genetica@hha.sld.cu