

Valoración de la técnica de PCR-Southern blot para el análisis de la viremia en pacientes con hepatitis aguda A

M. Buti^b, R. Jardí^a, A. Bosch^c, F. Rodríguez^a, G. Sánchez^c, R. Pinto^c, X. Costa^a, J.F. Sánchez-Ávila^b, M. Cotrina^a, R. Esteban^b y J. Guardia^b

Servicios de ^aBioquímica y ^bHepatología. Hospital General Vall d'Hebron. ^cDepartamento de Microbiología. Universidad de Barcelona.

RESUMEN

El análisis de la viremia en la infección por el virus de la hepatitis A (VHA) mediante los métodos convencionales es poco utilizado debido a que la determinación viral se realiza habitualmente en heces y a que las técnicas empleadas son laboriosas y tienen baja rentabilidad diagnóstica. Los objetivos de este trabajo son el desarrollo de un método de amplificación génica y Southern blot para la detección de ARN-VHA en el suero de los pacientes con infección aguda y relacionar la presencia de ARN-VHA con la detección de anticuerpos anti-VHA de tipo IgM y los valores de la alanina aminotransferasa (ALT). El ARN-VHA se ha estudiado en 26 muestras de suero de 21 pacientes con hepatitis aguda A, en 11 muestras de pacientes con hepatitis aguda B y en 15 con hepatitis aguda no A, no E. El ARN-VHA se detectó en 10 (38%) de las 26 muestras de suero de pacientes con hepatitis aguda A. En cinco muestras fue positivo por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simple y en 10 mediante la técnica de PCR-Southern blot. El ARN-VHA fue positivo en el 100% de las muestras de suero obtenidas en la primera semana de la sintomatología clínica, en el 50% de las muestras de la segunda semana y no se detectó en ninguna de las muestras obtenidas posteriormente. No se detectó ARN-VHA en ninguno de los 11 casos de hepatitis aguda B ni de los 15 de hepatitis aguda no A, no E. No se observó una relación significativa entre la detección de ARN-VHA y el grado de positividad de los anticuerpos anti-VHA de tipo IgM, pero sí en cambio con el aumento de la ALT.

En conclusión, la presencia de ARN-VHA en la hepatitis aguda A es frecuente, pero su detección es transitoria durante las primeras 2 semanas del inicio de la sintomatología clínica y requiere de una técnica de amplificación génica y Southern blot.

DETECTION OF HEPATITIS A VIRUS RNA BY PCR-SOUTHERN BLOT IN SERUM FROM PATIENTS WITH ACUTE HEPATITIS A

Assessment of viremia in hepatitis A virus (HAV) infection is not frequently performed with conventional methods because the techniques used are laborious, have low sensitivity and are usually performed in feces. The aims of this study were to develop a polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot technique to detect HAV-RNA in the serum of patients with acute HAV infection and to determine the relationship between HAV-RNA and anti-HAV IgM and alanine aminotransferase (ALT) levels. The presence of HAV-RNA was studied in 26 serum samples from 21 patients with acute hepatitis A. We also studied 11 samples from patients with acute hepatitis B and 15 samples from patients with non-A, non-E hepatitis. HAV-RNA was detected in 10 (38%) of the 26 serum samples from patients with acute hepatitis A. Simple PCR was positive in 5 samples and PCR-Southern blot was positive in 10. All the serum samples obtained during the first week of onset were HAV-RNA positive and 50% of those obtained during the second week were positive. None of the serum samples obtained after the second week of onset were HAV-RNA positive. None of the serum samples from the 11 patients with acute hepatitis B or from the 15 patients with non-A, non-E acute hepatitis were positive for HAV-RNA. No significant relationship was detected between HAV-RNA detection and an IgM anti-HAV or ALT positive result. In conclusion, the presence of HAV-RNA in acute hepatitis A is frequent but the PCR Southern blot technique is required for detection, which is transitory during the first weeks after onset.

(*Gastroenterol Hepatol* 2001; 24: 1-4)

Correspondencia: Dra. M. Buti.
Servicio de Hepatología.
Hospital General Universitario Vall d'Hebron.
P.º Vall d'Hebron, 119. 08035 Barcelona.

Recibido el 18-5-2000; aceptado para su publicación el 13-7-2000.

El virus de la hepatitis A (VHA) es un virus ARN monocatenario de polaridad positiva que pertenece a la familia *Picornaviridae*. La cápside del VHA está constituida por tres polipéptidos denominados VP1, VP2, VP3 y posiblemente un cuarto, VP4, aunque éste no ha sido detectado en los viriones^{1,2}.

El VHA se transmite por vía enteral. En los países en vías de desarrollo la mayoría de las infecciones por el VHA ocurren en la infancia, mientras que en los países industrializados la infección se presenta sobre todo en adultos jóvenes. En España, el patrón epidemiológico de la infección por el VHA ha variado en las últimas décadas, en relación con la mejoría de las condiciones higiénicas y ambientales, y es similar al de las zonas de baja endemicidad^{3,4}.

El diagnóstico de la infección aguda por el VHA se realiza habitualmente mediante la detección de anticuerpos de tipo IgM frente al VHA (anti-VHA IgM). Estos anticuerpos se detectan aproximadamente a las 3-7 semanas después de la infección con el virus, en algunos casos antes de la presentación de la sintomatología clínica y de la elevación de los valores de las transaminasas séricas. Estos anticuerpos alcanzan su valor máximo a los 15-30 días del inicio del cuadro clínico y van declinando hasta desaparecer en un intervalo de 3-6 meses, cuando las manifestaciones clínicas de la enfermedad han cedido. El diagnóstico de la infección mediante la detección de la viremia o la presencia viral en las heces de los pacientes es poco utilizado, ya que tanto la excreción fecal del virus como la viremia son transitorios, por lo que un resultado negativo no excluye el diagnóstico de infección aguda por el VHA^{5,6}.

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza ampliamente para la evaluación de la viremia y el diagnóstico de infecciones virales, sobre todo en la hepatitis viral crónica causada por el virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC). La técnica de PCR es muy sensible, ya que permite detectar bajos niveles de ADN o ARN de los diferentes virus incluso en ausencia de anticuerpos específicos, por lo que es útil para el diagnóstico de infecciones agudas virales en fases iniciales, como ocurre en el diagnóstico de la hepatitis aguda VHC en el caso de sujetos inmunodeprimidos^{7,8}.

El objetivo de este trabajo es la aplicación de un método de retrotranscripción (RT) seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y Southern blot para la detección de ARN-VHA en el suero de una serie de pacientes con hepatitis aguda A, hepatitis aguda B y hepatitis aguda no A, no E. El ARN-VHA se ha determinado en muestras consecutivas de suero y su detección se ha relacionado con la presencia y el título de los anticuerpos anti-VHA de tipo IgM y los valores de las transaminasas séricas.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes

El ARN-VHA se ha estudiado en 26 muestras de suero pertenecientes a 21 pacientes con hepatitis aguda por el VHA, en 11 muestras de pacientes con hepatitis aguda por el VHB y 15 muestras de suero de pacientes catalogados como hepatitis aguda no A, no E. De las 26 muestras de suero de los pacientes con hepatitis aguda A, cinco fueron obtenidas durante la primera semana del inicio de la sintomatología clínica, 10 durante la segunda semana y en 6 casos entre la tercera y la cuarta semana. En los 5 pacientes con muestra de suero inicial obtenida durante la primera semana se analizó una segunda muestra de suero obtenida al mes. En los casos de hepatitis aguda por el VHB y hepatitis aguda no A, no E se utilizó una muestra de suero obtenida en los primeros 15 días del inicio de la sintomatología clínica.

El diagnóstico de infección aguda se realizó por la presencia de un cuadro clínico característico y la elevación de los valores de transaminasas séricas 10 veces por encima del límite superior del intervalo de referencia establecido. El diagnóstico de hepatitis aguda A se basó en la positividad de los anticuerpos anti-VHA de tipo IgM. El diagnóstico de infección aguda B se basó en la positividad de los anticuerpos de tipo IgM frente al VHB (anti-HBc IgM) y del antígeno de superficie del VHB (HBsAg). El diagnóstico de hepatitis aguda no A, no E se basó en la ausencia de anti-VHA IgM, anti-HBc IgM, anticuerpos totales frente al virus de la hepatitis C (anti-VHC), ARN-VHC y anticuerpos frente al virus de la hepatitis E (anti-VHE).

Métodos

La determinación de anticuerpos anti-VHA IgM, anti-HBc IgM y anti-VHC se realizó mediante técnicas inmunométricas (ANTI-HAV IgM, ANTI-HBV IgM, ANTI-HCV, Vitros Immunodiagnostic, Ortho-Clinical Diagnostic, EE.UU.). La determinación de anticuerpos anti-VHE se efectuó por enzimoimmunoanálisis (ANTI-HEV Abbot Diagnostic, EE.UU.). La determinación de ARN/VHC se efectuó mediante RT-PCR (HCV DiaSorin, Italia).

Determinación de ARN-VHA mediante RT-PCR Southern blot

La extracción y detección de ARN-VHA se realizó siguiendo los métodos previamente descritos^{9,10}. Brevemente, 10 µl de ARN se desnaturalizaron durante 5 min a 99 °C y posteriormente se añadieron a una mezcla de reacción que contenía 6,25 U de transcriptasa inversa (Expand™ Reverse Transcriptase, Roche), 5 µl de tampón, 0,5 µM del cebador HAV 240 (5'-GGAGAGCCCTGGAAGAAAGA-3'), que corresponde a la región comprendida entre los nucleótidos 241 y 222 de la cepa salvaje HM-175, 0,2 mM de nucleótidos y 10 mM de DTT. La reacción se llevó a cabo durante una hora a 45 °C. Para proceder con la reacción de PCR, a 10 µl del producto de la retrotranscripción se añadieron 5 µl de tampón PCR 10X, que contenía una concentración 15 mM de MgCl₂, 0,5 µM del primer HAV-240, 0,5 µM del primer HAV-68 (5'-TCACCGCGTTTGCCTAG-3') que corresponde a la región que va del nucleótido 68 a 85 de la cepa salvaje HM-175, 0,2 mM de la mezcla de nucleótidos y 0,5 U de la mezcla enzimática de amplificación. La amplificación se efectuó en un termociclador (Perkin Elmer 9600) y consistía en una desnaturalización inicial de 4 min a 94 °C, 40 ciclos de amplificación incluyendo cada uno una desnaturalización de 1 min a 94 °C, una hibridación de 1 min a 55 °C y una extensión de 1 min y 30 s a 72 °C, a la cual seguía finalmente una extensión de 10 min a 72 °C. Los productos se analizaron en gel de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio.

Para la confirmación de las muestras positivas se utilizó un método de transferencia por Southern blot e hibridación con una sonda interna. La sonda utilizada 5'-TTAATTCTTGCAAGTTCAGG-3' se encuentra localizada en la posición 150-169 de la cepa salvaje HM-175 y está marcada en el extremo 5' con digoxigenina. El revelado de la hibridación se efectuó por autorradiografía.

La sensibilidad del método se estudió realizando diluciones de la cepa vírica HM-175 en un pool de sueros control negativo. A partir de las muestras que contenían las diferentes concentraciones del stock viral se procedió a la extracción del ARN-VHA y la posterior RT-PCR Southern blot.

Análisis estadístico

Para la comparación de medias se aplicó el test de la t de Student. Cuando no se cumplían las condiciones de aplicación se utilizaron pruebas no paramétricas. Los cálculos estadísticos se realizaron con el programa SPSS 6.0 para Windows.

RESULTADOS

El producto de la amplificación de RT-PCR del fragmento de ARN-VHA se visualizó en la electroforesis en agarosa como una banda que correspondía al tamaño esperado de 189 pb. La especificidad de la banda de amplificación se comprobó mediante hibridación con la sonda específica marcada con digoxigenina. En la figura 1 se

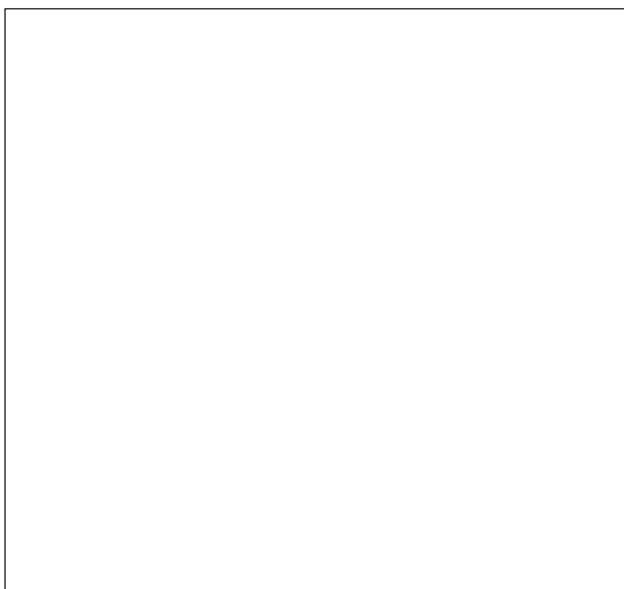


Fig. 1. Determinación de ARN-VHA mediante las técnicas de RT-PCR y Southern blot. A) Detección de ARN-VHA mediante RT-PCR, electroforesis en gel de agarosa del producto de la PCR y tinción con bromuro de etidio. 1: control negativo de la extracción; 2: control negativo de la reacción de RT; 3: control negativo de la técnica de PCR; M: marcador de tamaño molecular X174 Hae III; 4-8: muestras ARN-VHA positivo; 9: control ARN-VHA positivo. B) Resultados obtenidos con la técnica Southern blot e hibridación de los productos de la PCR con una sonda marcada con digoxigenina. RT: retrotranscripción. PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

muestran los resultados de la electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio de los productos de la RT-PCR y de la hibridación Southern blot. La sensibilidad del método de PCR simple fue de 4.000 partículas virales por ml, mientras que la del método de RT-PCR

Southern blot fue de 400 partículas virales por ml. El ARN-VHA se detectó en 10 (38%) de las 26 muestras de pacientes con hepatitis aguda A. En cinco muestras fue positivo por la técnica de PCR simple y en 10 mediante la técnica de PCR-Southern blot. Todas las muestras positivas por el método de PCR simple fueron también positivas por la técnica de Southern blot.

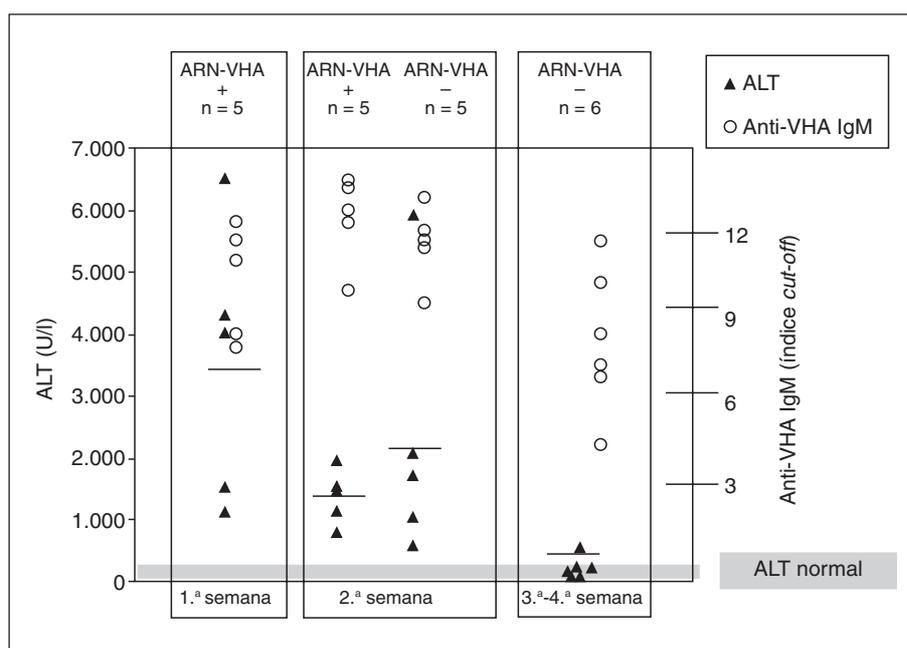
El ARN-VHA fue positivo en las cinco muestras de suero obtenidas durante la primera semana del inicio de la sintomatología clínica tanto por la técnica de PCR simple como por la de Southern blot, mientras que en cinco de las 10 muestras obtenidas durante la segunda semana el ARN-VHA fue positivo únicamente mediante la técnica de Southern blot. No se detectó ARN-VHA en ninguna de las muestras de suero obtenidas a partir de la segunda semana del inicio de la sintomatología clínica de los pacientes con hepatitis aguda A. El ARN-VHA fue negativo en las 11 muestras pertenecientes a hepatitis aguda B y en las 15 restantes de pacientes catalogados como hepatitis aguda no A, no E.

No se observó relación significativa entre la detección de ARN-VHA y el título de los anticuerpos anti-VHA IgM, valorado mediante el grado de positividad de la muestra con relación al *cut-off* del método inmunométrico (fig. 2). El ARN-VHA se detectó en el 64% de las muestras con valores de ALT superiores a 1.000 U/l y en ninguna de las muestras con valores de ALT inferiores a 500 U/l ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En la estandarización de una técnica de PCR para la detección de un genoma viral que presenta una variabilidad significativa, como ocurre con los virus ARN, es muy importante valorar la localización de los cebadores utilizados en la amplificación del genoma por PCR. Los estu-

Fig. 2. Determinación de ARN-VHA mediante la técnica de RT-PCR-Southern blot en la hepatitis aguda por el VHA. Se presenta la detección o ausencia de ARN-VHA en los 21 pacientes estudiados, en muestras obtenidas a la primera, segunda y tercera-cuarta semanas del inicio de la sintomatología clínica en relación con los valores de la ALT y los títulos de anti-VHA de tipo IgM.



dios de polimorfismo del VHA han demostrado que las regiones VP3 y VP1 son las que presentan una mayor variabilidad, mientras que la región 5' no codificante está más conservada entre los diferentes genotipos del VHA^{5,11}. Por esta razón, la región 5' del genoma viral es la aconsejada para seleccionar los cebadores. En nuestro estudio, el uso de cebadores correspondientes a la zona 5' y el empleo de una técnica de PCR Southern blot ha permitido conseguir una buena sensibilidad en la detección de ARN-VHA (400 copias por ml).

La mayoría de los estudios que han evaluado la viremia en la infección por el VHA se han realizado en chimpancés. Algunos de estos trabajos han utilizado métodos indirectos, como la detección de antígenos virales mediante técnicas de RIA o ELISA¹². Los estudios realizados en humanos son escasos y han analizado la presencia de ARN-VHA, ya sea a partir de suero o de heces de pacientes. Algunos de ellos han empleado la técnica de PCR, procedimiento más fácil, rápido y sensible que la detección de proteínas virales. Sin embargo, la escasa casuística de estos trabajos impide realizar un análisis profundo para conocer la duración y la frecuencia de la detección de la viremia en la infección aguda por el VHA. La información disponible de la relación entre la presencia de ARN-VHA, los valores de anti-VHA IgM y el valor de las transaminasas séricas es también escasa^{13,14}.

En este estudio, se ha detectado ARN-VHA en 10 (67%) de las 15 muestras de pacientes con hepatitis aguda A, obtenidas en las primeras 2 semanas, no detectándose en otras hepatitis virales como la hepatitis B o las hepatitis catalogadas como no A, no E. En todos los casos el ARN-VHA se identificó en los pacientes que presentaban valores de ALT elevados y estaban en la fase clínica inicial de la hepatitis aguda. El estudio de muestras de suero consecutivas ha demostrado que la presencia de ARN-VHA es transitoria, detectándose únicamente durante los primeros días de la infección; siendo posteriormente indetectable incluso utilizando una técnica de PCR-Southern blot. A diferencia de otros autores no hemos observado ninguna correlación entre la detección de ARN-VHA y el título de anticuerpos de tipo IgM frente al VHA, lo que podría explicarse por diversos motivos. Uno de ellos estaría relacionado con la elevada producción de anticuerpos observada en la fase inicial de la infección aguda (aproximadamente en los primeros 15 días de la infección) en respuesta a la replicación viral que daría lugar a un fenómeno de saturación en la reacción antígeno-anticuerpo de las técnicas de ELISA convencionales utilizadas para la detección semicuantitativa de anti-VHA IgM. Por este motivo, en la mayoría de los casos, y a pesar de realizarse diluciones de la muestra de suero, no se detectaron diferencias en los títulos de anticuerpo anti-VHA IgM estadísticamente significativos entre las muestras positivas y las negativas para el ARN-VHA.

En este trabajo, el ARN-VHA se detectó solamente en pacientes con valores de ALT 10 veces superiores al rango de normalidad, y no se detectó en pacientes con valores de ALT elevados pero menos de 10 veces los valores normales (rango, 44-440 U/l). En este aspecto, sería interesante comprobar si en los casos de hepatitis aguda bifásica,

más frecuentes en adultos, el ARN-VHA se detecta también en forma bifásica y si estos pacientes presentan viremia más prolongada y, por tanto, el riesgo de infección es más elevado. La experiencia en esta situación es muy escasa, ya que la determinación de ARN-VHA en la hepatitis aguda no se realiza habitualmente y menos durante la fase de recuperación de la infección.

En resumen, este estudio demuestra que la técnica de PCR-Southern blot es útil para la detección de la viremia en las fases iniciales de la infección aguda por el virus A, pero su incorporación a la práctica clínica diaria está limitada por la elevada precisión y facilidad del diagnóstico serológico.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a las Sras. Isabel Gil y Montserrat Gimferrer, diplomadas en enfermería, su colaboración en las determinaciones técnicas de los distintos marcadores séricos.

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por los proyectos ERB3514PL973098 INCO de la UE, BIO99-0455 de la CICYT y 199936ROOO22 de la Generalitat de Catalunya.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lemon SM. Type A viral hepatitis: epidemiology, diagnosis, and prevention. *Clin Chem* 1997; 43: 1494-1499.
2. Cohen JL, Ticehurst JR, Purcell RH, Buckler-White A, Baroudy BM. Complete nucleotide sequence of wild-type hepatitis A virus: comparison with different strains of hepatitis A virus and other picorna viruses. *J Virol* 1987; 61: 50-59.
3. Vargas V, Buti M, Hernández JM, Jardí R, Portell A, Esteban R. Prevalencia de los anticuerpos contra el virus de la hepatitis A en la población general. Estudio comparativo, 1977-1985. *Med Clin (Barc)* 1987; 88: 144-146.
4. Bayas JM, Bruguera M, Vilella A, Carbó JM, Vidal J, Navarro G. Prevalencia de la infección por el virus de la hepatitis B y hepatitis A en estudiantes de profesiones sanitarias en Cataluña. *Med Clin (Barc)* 1996; 107: 281-284.
5. Yotsuyanagi H, Koike K, Yasuda K, Moriwa K, Shintani Y, Fujie H et al. Prolonged faecal excretion of hepatitis A virus in adult patients with hepatitis A as determined by polymerase chain reaction. *Hepatology* 1996; 24: 10-13.
6. Normann A, Pfisterer M, Schade S, Graff J, Chaves RL, Crovari P. Molecular epidemiology of an outbreak of hepatitis A in Italy. *J Med Virol* 1995; 47: 467-471.
7. Jardí R, Buti M, Cotrina M, Rodríguez-Frías F, Costa X, Pascual C. Determinación cuantitativa de ADN-VHB en la hepatitis crónica B. Comparación de tres métodos. *Gastroenterol Hepatol* 1998; 21: 327-331.
8. Gretch DR, Carithers R, Willson R, Williams B, Corey L. Assessment of hepatitis C viremia using molecular amplification technologies: correlations and clinical implications. *Ann Intern Med* 1995; 123: 321-329.
9. Boom R, Sol CJA, Salimans CL, Jansen PM, Van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 495-503.
10. Bosch A, Sánchez G, Le Guyader F, Vanaclocha H, Hungarreau L, Pinto RM. Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Wat Sci Tech* 2000. En prensa.
11. Janse RW, Newbold JE, Lemon SM. Complete nucleotide sequences of a cell culture adapted variant of hepatitis A virus: comparison with wild type virus restricted capacity for *in vitro* replication. *Virology* 1988; 163: 299-307.
12. Cohen JI, Feinstone S, Pucell RH. Hepatitis A virus infection in a chimpanzee: duration of viremia and detection of virus in saliva and throat swabs. *J Infect Dis* 1989; 5: 887-890.
13. Fujiwara K, Yokosuka O, Ehata T, Imazeki F, Saisho H, Miki M et al. Frequent detection of hepatitis A viral RNA in serum during the early convalescent phase of acute hepatitis A. *Hepatology* 1997; 26: 1634-1639.
14. Oren R, Shouval D, Tur-Kaspa R. Detection of hepatitis A virus RNA in serum from patients with acute hepatitis. *J Med Virol* 1989; 28: 261-263.