

Diseño de oligonucleótidos que reconocen específicamente el virus de la Hepatitis B.

Romero, N. (1)

Design of oligonucleotides for the detection Hepatitis B virus.

Abstract

Hepatitis B is a liver infection caused by the potentially deadly Hepatitis B virus (HBV). About 600 000 people die each year from the serious consequences of HBV. HBV has a partially double-stranded DNA, semicircular, enveloped belonging to the family Hepadnaviridae.

The use of virological tests in the study of Hepatitis B has become an essential tool for the diagnosis, the guideline for treatment decisions and to evaluate the response to antiviral treatment. The objective was to develop new primers to identify specifically the Hepatitis B virus, using the technique of chain reaction (PCR).

DNA was obtained from different sera, five negative and five positive for the virus, checked by virological tests that recognize the surface antigen and IgM anticore. From the complete sequence of the virus obtained from the NCBI database (National Center for Biotechnology Information) designed a pair of oligonucleotides, which allowed amplify a fragment of the viral genome of 630 bp. The fragment was sequenced in both directions coincide with the published sequence for the VHB.

Key word: Virus, Hepatitis B, Oligonucleotides, PCR

Resumen

La Hepatitis B es una infección hepática potencialmente mortal causada por el virus de la Hepatitis B (VHB). Alrededor de 600.000 personas mueren cada año por las consecuencias graves del VHB. El VHB posee un DNA de doble hebra parcial, semicircular, con envoltura y pertenece a la familia Hepadnaviridae. El uso de tests virológicos en el estudio de la Hepatitis B se ha convertido en una herramienta esencial para el diagnóstico, el lineamiento de las decisiones terapéuticas y para la evaluación de la respuesta al tratamiento antiviral.

El objetivo del trabajo fue desarrollar nuevos oligonucleótidos que permitan identificar específicamente el virus de la Hepatitis B, utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se obtuvo el ADN a partir de diferentes sueros, cinco negativos y cinco positivos para el virus, chequeados por test virológicos que reconocen el antígeno de superficie y el anticore IgM. A partir de la secuencia completa del virus obtenida de las base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) se diseñó un par de oligonucleótidos, que permitió amplificar un fragmento del genoma del virus de 630 pb. El fragmento fue secuenciado en ambos sentidos mostrando una homología total, con la secuencia publicada para el VHB.

Palabras clave: Virus, Hepatitis B, Oligonucleótidos, PCR.

(1) Laboratorio de Nanodiagnóstico. Centro de Investigación e Innovación Tecnológica (CENIIT). Universidad Nacional de La Rioja (UNLaR). Av. Luis Vernet y Apóstol Felipe. La Rioja (5300). Te: 03822-433843 nahuelromero@yahoo.com.ar

Introducción

La Hepatitis B es una infección vírica del hígado que puede producir una enfermedad crónica grave. Constituye un importante problema de salud mundial y es el tipo más grave de Hepatitis vírica. Puede causar hepatopatía crónica y conlleva un alto riesgo de muerte por cirrosis y cáncer hepático.

El virus de la Hepatitis B (VHB) se transmite por contacto con la sangre u otros líquidos corporales de una persona infectada. El VHB es unas 50 a 100 veces más infeccioso que el VIH (virus del sida) y representa un importante riesgo laboral para los profesionales sanitarios (WHO, 2008).

El virus de la Hepatitis B es un virus envuelto, de 40-42 nm de diámetro con un core central. Su material genético es una cadena parcialmente doble de DNA (Ganem and Prince, 2004). El uso de tests virológicos en el estudio de las Hepatitis virales se ha convertido en una herramienta esencial para el diagnóstico, el lineamiento de las decisiones terapéuticas y para la evaluación de la respuesta al tratamiento antiviral.

Los tests virológicos se pueden dividir en dos grandes aproximaciones: a) tests serológicos (marcadores serológicos) para el estudio de anticuerpos y/o antígenos y b) tests moleculares para el estudio cualitativo y/o cuantitativo del RNA o DNA viral y su tipificación (Wright, 2006). A las seis semanas después de la infección viral se detectan los marcadores serológicos: HBsAg (proteína codificadas en el DNA viral, localizadas en la superficie de la envoltura del virus) y marcadores de replicación viral activa: HBeAg (proteína que ancla el DNA viral a la cápside) (Singh et al., 2007). El lapso que transcurre entre la infección y la aparición de los marcadores serológicos se denomina "período ventana serológico" y varía según la sensibilidad de los equipos utilizados para detectarlos.

En el caso de la Hepatitis B puede durar hasta seis semanas (Qiu et al., 2010). Esto representa un grave peligro para los bancos de donación de sangre, ya que un suero infectado antes de las seis semanas dará por las técnicas serológicas negativo, siendo que en realidad posee el virus.

Las transfusiones pueden ser un medio de contagio de virus que producen graves enfermedades. Por esto, mientras los hospitales y sanatorios realizan estrictos controles sobre la sangre de los donantes, la ciencia busca aportar métodos cada vez más efectivos para detectar agentes patógenos.

En este sentido se diseñaron nuevos oligonucleótidos que reconocen específicamente el material genético del virus de la Hepatitis B, esto permite detectar directamente el virus de 24 a 48 hs post-infección y poder desarrollar en un futuro nuevas técnicas, conjugando a estos oligonucleótidos Nanomarcadores, como sistemas de detección.

Materiales y métodos

Extracción de ADN: Se utilizó 5ml de sangre total de cada muestra y se agregó 2 ml de solución de Lisis (NaCl 0,14 M, acetato de magnesio 1,5 mM, KCl 5 mM y dodecil sulfato sódico al 1%) y 2 ml de FCI (25:24:1 partes de fenol/cloroformo/isoamilico cada uno respectivamente). Se agitó vigorosamente durante 15 segundos y posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Luego de la fase acuosa se extrajeron 2 ml y se le agregaron 0,2 ml de acetato sódico 3 M, homogenizando suavemente por inversión. Se añadieron 5 ml de etanol absoluto, centrifugando a 3500rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante por inversión y una vez escurrido el sobrenadante se agregó 100 ul de TE pH 7,5, durante 24hs en la estufa a 37°C.

Diagnóstico Serológico

Los diagnósticos se realizaron por test serológicos que reconocen el antígeno de superficie y el anticore IgM, utilizando para ello la técnica de inmunoanálisis enzimático de micropartículas (Engvall and Perlman, 1971) a través del sistema IMX (ABBOTT Diagnostics Division).

Reacción de PCR

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador PTC-100, MJ Research, programado de la siguiente manera: 1 ciclo de desnaturalización inicial de 94 °C por 5 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 53 °C por 60 segundos y 72 °C por 90 segundos. Finalmente 1 ciclo extensión final a 72 °C por 7 minutos.

La composición de la reacción de PCR fue de 20 µl determinada por: 1X de Buffer Green GoTaq™ ADN polimerasa (Promega), 2 mM de MgCl₂ (Promega), 100 µM de una mezcla de dNTPs (Promega), 0,2 µM de cada oligonucleótido, 0,05 U/µl de GoTaq™ Polimerasa (Promega), 30 ng de ADN y agua ultrapura (GIBCO). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Biodynamics S.R.L (Argentina).

Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis a 90 voltios durante 1 hora 35 minutos en geles al 1,2 % de agarosa D1-LE (Biodynamics) preparados con TBE (13.5 g Tris Base; 5.5 g de H₃BO₃, 4 ml de 0.5 M de EDTA pH 8). Una vez concluida esta etapa, el gel fue fotografiado con un equipo de fotodocumentación dotado con un transiluminador UV (Gel Doc 100 Gel Documentation System, Bio-Rad) y cuya imagen fue digitalizada para su posterior análisis con un programa de análisis molecular (Molecular Analysis de BIO-RAD). Los secuenciamientos se realizaron en ambas hebras de ADN (Magrogen).

Resultados

Diseño de los oligonucleótidos específicos para el VHB

Utilizando la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) se extrajo la secuencia completa del virus de la Hepatitis B (Número de acceso: X60213.1) y sus diferentes variantes genotípicas (A, B, C, D, E, F y G).

Las siete variantes se alinearon utilizando el Software BioEdit (Hall, 2007) y MEGA4 (Tamura et al., 2007). Se seleccionó una región de 2500 pb que comparten todas las variantes genotípicas y de esa región se diseñó un par de oligonucleótidos (Tabla 1) para ser utilizados en la reacción de PCR.

Detección del VHB en sueros humanos por PCR

Se utilizaron los oligonucleótidos para amplificar por PCR un fragmento de 630 pb del virus de la Hepatitis B (VHB). Para esto se utilizaron 10 sueros de diferentes pacientes, 5 negativos y 5 positivos para el VHB. Las determinaciones del virus se realizaron por test virológicos que reconocen el antígeno de superficie y el anticore IgM. Cada suero fue analizado por separado y posteriormente los cinco sueros negativos se unificaron para descartar cualquier reacción cruzada no específica, en tanto los positivos se analizaron por separado para tener una aproximación de la sensibilidad de la técnica (Fig. 1). El fragmento amplificado de los cinco sueros positivos fue purificado y enviados a secuenciar. Posteriormente la secuencia se alineó con la existente en la Base de Datos: Basic Local Alignment Search Tool (BLAST- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se obtuvo un 100% de homología con el genoma del virus de la Hepatitis B, mostrando que los oligonucleótidos diseñados eran altamente específicos.

Discusión

Cada año el virus de la Hepatitis B (VHB) infecta de 10 a 30 millones de personas en todo el mundo. La mayoría son niños y adolescentes.

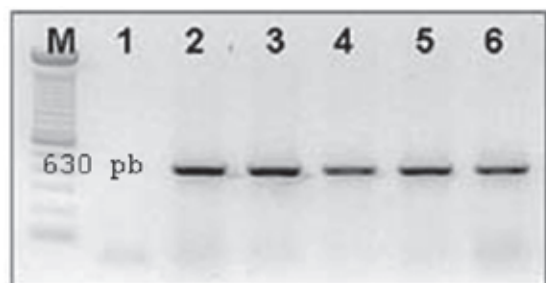


Fig.1- Fragmento amplificado en gel de agarosa 1% con la secuencia de 630pb. M: marcador de peso molecular, 1: Sueros negativos, 2-6: Sueros positivos para el VHB.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS 2008), cerca de un tercio de la población mundial – alrededor de 2 mil millones de personas – han estado expuestas al virus de la Hepatitis B (VHB) a través del contacto con sangre o con fluidos orgánicos infectados.

Dichas infecciones pueden ocurrir durante el parto, al compartir agujas infectadas o por transfusiones de sangre infectada. De acuerdo con el Comité Consultivo acerca de Prácticas de Inmunización de los Centros Nacionales para el Control y la Prevención de Enfermedades (NIH-E.E.U.U.), entre el 20 y 35 por ciento de las personas infectadas durante su infancia padecerán hepatopatías graves, la mayoría durante su adultez.

La OMS estima que la Hepatitis B causa la muerte de 1.3 a 1.5 millones de niños y adultos por año en todo el mundo.

Las técnicas que se utilizan actualmente en los bancos de donación y trasfusión de sangre, son técnicas indirectas, es decir no determinan directamente al virus o bacteria, sino que detectan los anticuerpos que estos generan en el organismo. Esto tiene un gravísimo problema que es el llamado “período ventana”. Es decir que hasta pasadas las seis semanas de la infección, no empiezan a detectarse estos anticuerpos en sangre. Este “período ventana” que incluso en algunos pacientes puede ser de mayor tiempo, representa un grave peligro ya que pueden catalogarse sueros negativos cuando en realidad están infectados con algún virus o bacteria y con el consiguiente contagio para la persona receptora de esa sangre.

La técnica de PCR (Reacción en cadena de la Polímera) es una técnica basada en Biología Molecular y que permite detectar directamente el virus o bacteria, desde las 24 o 48 hs de ingresar al organismo, ya que reconoce su material genético.

Tiene la desventaja de ser una técnica muy costosa, requiere de equipos especiales y un laboratorio con equipamiento para trabajar en Biología Molecular, todos estos aspectos económicos y técnicos hacen que en los países en vías de desarrollo no se utilice como técnica de rutina y se siga empleando las técnicas indirectas.

Olinucleótido	Secuencia
Cebador hacia delante	5' GTG GTG GAC TTC TCT CAA TTT TC 3'
Cebador reverso	5' CGG TAT AAA GGG ACT CAA GAT 3'

Tabla 1- Secuencia de los oligonucleótidos que reconocen específicamente un fragmento de 630 pb del virus de la Hepatitis B (VHB).

La Línea de investigación en Nanodiagnóstico de enfermedades Infecciosas que se lleva adelante en el Centro de investigación e Innovación Tecnológica (CENIIT-UNLaR), permitirá poder tener mayor sensibilidad y especificidad que la técnica de PCR, reduciendo enormemente los costos y requerimientos técnicos al punto que se puedan realizar en cualquier centro de atención de la salud primario o en zonas rurales, con equipos portátiles.

Esta tecnología podría ser aplicada en las técnicas futuristas de “pruebas cerca del paciente” (point-of-care, POCT-National Academy of Clinical Biochemistry) (Nichols 2007) y en tecnología de lab-on-chip, el laboratorio en un chip (Chen and Lindner 2009; Technology Review).

Agradecimientos

El proyecto fue financiado en su totalidad por el Programa “Estancias Científicas UNLaR 2011-2012”. Agradezco a las máximas Autoridades de la Universidad Nacional de La Rioja, Prof. Dr. Enrique Daniel Nicolás Tello Rondán y Prof. Dr. Sergio Eduardo Martín por incentivar y apoyar el desarrollo Científico y Tecnológico. Agradezco el permanente apoyo y seguimiento recibido por parte de la Sra. Secretaria de Ciencia y Técnica, Prof. Ing. Claudia Santander, por el Director del CENIIT, Prof. Ing. Víctor Abelardo Rodríguez y el Secretario Técnico del CENIIT, Prof. Mg. Ing. Oscar Ángel Peñaloza. Agradezco a la Dra. Inés Redolfi y al Ing. Mg. German Pratt por sus sugerencias en la escritura del trabajo.

Referencias

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Chen Jane and Lindner Erno. 2009. Lab-on-Chip Flow Injection Analysis System without an External Pump and Valves and Integrated with an In Line Electrochemical Detector. *Anal. Chem.* 24: 9955-9960.

Engvall, E.; Perlman P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochem* 8 (9): 871-874.

Ganem, D.; Prince, A. 2004. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *New England Journal of Medicine* 350: 1118-1124.

Hall, T. 2007. Ibis Biosciences A subsidiary of Abbott Molecular 2251 Faraday Avenue. Carlsbad, CA 92008 760-476-3375.

Qiu, L.; Binns, C.W.; Zhao, Y.; Zhang, K.; Xie, X. 2010. Hepatitis B and breastfeeding in Hangzhou, Zhejiang Province, People's Republic of China. *Breastfeed Med* 5: 109-112.

National Academy of Clinical Biochemistry. http://wn.com/National_Academy_of_Clinical_Biochemistry.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Nichols, J.H. 2007. Point of care testing. *Clin Lab Med* 27:893-908.

Singh, R.; Kaul, R.; Kaul, A.; Khan, K. 2007. A comparative review of HLA associations with Hepatitis B and C viral infections across global populations. *World journal of gastroenterology* 13:1770.

Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-9.

Technology Review. <http://www.technologyreview.com>

Wright, T.L. 2006. Introduction to Chronic Hepatitis B Infection. *The American Journal of Gastroenterology* 101: S1-S6.

WHO 2008. World Health Organization. Hepatitis B. World Health Organization Fact Sheet No. 204.