

## Detección de ADN del virus B en suero de niños con hepatitis aguda prolongada, hepatitis crónica activa y portadores asintomáticos

M. G. MORALES,<sup>1</sup> M. NAZÁBAL,<sup>2</sup> C. CASTAÑEDA,<sup>1</sup> N. RODRÍGUEZ,<sup>1</sup> R. SILVA,<sup>2</sup> A. MALBERTY<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Gastroenterología, Calle 25 No. 503, Vedado, La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Apartado 6162, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido en abril de 1990

Aprobado en agosto de 1990

### RESUMEN

La hibridación del ADN del virus de la hepatitis B ha mostrado ser un método sensible y específico para medir la replicación viral. En el presente trabajo se reporta la relación entre la presencia de ADN del virus de la hepatitis B y el sistema AgeHB/antieHB en sueros de niños, por los métodos dot-blot y ELISA, cinco de los niños con hepatitis aguda prolongada (HAP), 34 con hepatitis crónica activa (HCA) y en 23 portadores asintomáticos. Se encontró relación entre el ADN viral y el AgeHB positivos (14/17) para el 82%, y entre el antieHB y el ADN positivos (19/38) para el 50% de la muestra. En el estudio se demuestra que la hibridación de ADN del virus B nos da una información más útil como marcador de replicación viral que el sistema inmunológico AgeHB/antieHB, lo que constituye el aspecto más relevante del presente trabajo.

### SUMMARY

Hybridization of DNA from the hepatitis B virus has shown to be a sensible and specific method to measure viral replication. In this paper, we report the relationship between the virus DNA and the AgeHB/antieHB system in the serum of different children infected, either with Protracted Acute Hepatitis (PAH)-(5), Active Chronic Hepatitis (ACJ)-(34), and asymptomatic carriers (23). The methods used were ELISA and dot-blot hybridization. As a result, we found a relationship between the presence of viral DNA and the AgeHB positive (14/17) for an 82%, and between the antieHB and the viral DNA presence (19/38), for a 50%.

The study showed that the hybridization of DNA from the hepatitis B virus is a more useful and reliable method as a marker of viral replication if compared with the AgeHB/antieHB immunological system. This is, in fact, the most relevant aspect in this paper.

### INTRODUCCION

La identificación del virus de la hepatitis B, en suero, por hibridación molecular, es un método sensible y específico para detectar la presencia de replicación viral en pacientes (Chu *et al.*, 1985; Walter *et al.*, 1987).

Con la introducción de esta metodología se ha podido precisar en el criterio anteriormente utilizado para determinar la resolución de la enfermedad en los pacientes que hacen seroconversión al AgeHB, pues la existencia de ADN viral en los pacientes que tienen antieHB, ha demostrado que la replicación viral es activa (Bonino *et al.*, 1981).

El presente trabajo refiere la relación del ADN viral con el sistema AgeHB/antieHB, como marcadores de replicación del virus B de la hepatitis en niños con HAP, HCA y en portadores asintomáticos.

La literatura reciente confirma los resultados que reportan las relaciones entre el ADN y el sistema inmunológico AgeHB/antieHB, como marcadores de replicación viral, siendo superior el ADN viral en sensibilidad y especificidad (Walter *et al.*, 1987; Bartolomé *et al.*, 1988), aspecto de gran importancia confirmado en el presente trabajo.

En hepatitis aguda prolongada (Krogsgard *et al.*, 1985) sugieren que existe replicación viral en etapa temprana de la enfermedad y cuando aparecen los síntomas, pero los pacientes que tienen el ADN viral persistente por más de ocho semanas son los que pueden pasar al estado crónico, estando o no en relación con el AgeHB.

## MATERIALES Y METODOS

### Hepatitis crónica activa

Se incluyeron 34 pacientes con edad promedio de 12 años de ambos sexos, que tenían laparoscopias y biopsias hepáticas compatibles con hepatitis crónica activa o persistente, todos AgsHB positivos.

### Hepatitis aguda prolongada

El grupo estuvo formado por cinco niños con edad promedio de 10 años de ambos sexos, con más de tres meses de evolución, que tenían valores elevados de alaninamino transferasa y presencia de AgsHB al comienzo de la enfermedad e histología compatible con hepatitis aguda prolongada.

### Portadores asintomáticos

Ventitrés niños con edad promedio de 11 años, de ambos sexos, con pruebas de funcionamiento hepático normales así como biopsias y laparoscopia. El marcador serológico presente en todos los casos fue el AgsHB.

### Marcadores serológicos

En el suero de los pacientes se investigaron: AgsHB y AgeHB/antieHB, por el método ELISA (Organon Teknika, Holanda).

La hibridación de ácidos nucleicos se realizó empleando el método dot-blot (Scotto *et al.*, 1983, modificado).

### Preparación de la sonda

A partir del plasmidio pHBs-2 que contenía el gen HBsAg en el sitio EcoRI del pBR-322 (De la Riva *et al.*, 1986), se extrajo por digestión con la enzima EcoRI (ENZIBIOT) un fragmento de 892 pares de base correspondiente al gen del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, el cual fue clonado en el vector puc-8 y utilizado como sonda.

La sonda se marcó utilizando el método de iniciadores al azar (Cunningham y Mundy, 1987) con dATP  $\alpha$   $^{32}$ P (Amersham 3 000 Ci/mmol). La actividad específica estuvo entre  $2.4 \times 10^8$  cpm/ $\mu$ g de ADN sonda (Maniatis *et al.*, 1982).

### Preparación de las muestras de suero

A 10  $\mu$ l de suero diluido en agua destilada estéril (1:10), se le añadió polietilenglicol 6 000 concentración final 15%; las muestras se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron a 13 000 rpm en microcentrífuga durante 20 min. El precipitado obtenido se disolvió en 100  $\mu$ l/ml de TE 1X (hidroximetil metilamina 10 mM - ácido etilendiamino tetracético 1 mM), se desnaturalizó en igual volumen de NaOH 1 M/NaCl 1,5 M durante 30 min a temperatura ambiente. La mezcla se aplicó sobre papel de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA 85, 0,45 mm), utilizando equipo de ultrafiltración (Manifol, BIORAD-USA). Las manchas fueron neutralizadas con 100  $\mu$ l/ml de TRIS 0,5 M pH = 7,4 /NaCl 3 M. El filtro se horneó 2 horas a 80°C con vacío, continuando con la hibridación.

### Hibridación de ADN

El filtro se prehibridó durante 1 hora a 42°C con la mezcla compuesta por: solución Denhardt's 5 x, formamida al 50%, 5xSSC, 0,1% SDS y ARNt de levadura 10 mg/ml, a concentración final de 100  $\mu$ g/ml, y una relación de volumen de prehibridación de 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de filtro, continuando con la hibridación a 42°C durante 16-18 horas; en el filtro se aplicó  $2 \times 10^6$  cpm/ml de ADN sonda. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución 2xSSC/0,2% SDS 20 min a 50°C. Se pasó a lavar dos veces con solución 0,2xSSC/0,2% SDS durante 20 min, cada vez a 50°C.

El filtro se secó 10 min a temperatura ambiente y se expuso en casete con doble pantalla amplificadora 1-3 días a -70°C, para obtener así la autorradiografía (Maniatis *et al.*, 1982).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En la tabla 1 se muestran los resultados de la detección de ADN del virus de la hepatitis B en 34 niños con hepatitis crónica activa. Del total de casos con el ADN viral positivos (8/10), 80% coinciden con el AgeHB positivo y a (11/22), 50% de los que hicieron seroconversión, se les detectó el ADN en suero. Por otra parte, dos pacientes (20%) que eran AgeHB positivo,

no tenían el ADN como marcador de replicación viral y dos pacientes tuvieron negativos los marcadores AgeHB, antiHB y el ADN viral.

De un total de cinco niños con hepatitis aguda prolongada, se encontró uno con el AgeHB y ADN positivos mantenidos hasta los tres meses, estando en relación con la biopsia hepática; 4 de ellos habían hecho seroconversión y no se les detectó ADN circulante (tabla 2).

**Tabla 1**  
COMPORTAMIENTO DEL ADN DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS EN NIÑOS CON HEPATITIS CRONICA. RELACION CON EL SISTEMA AgeHB/antiHB (N = 34)

	ADN-HVB(+)	ADN-HVB(-)
AgeHB N = 10	8 (80%)	2 (20%)
AntiHB N = 22	11 (50%)	11 (50%)
AgeHB/antiHB N = 2	0	2 (100%)

N = Número de pacientes

**Tabla 2**  
MARCADORES SEROLOGICOS DEL VIRUS B EN NIÑOS CON HEPATITIS AGUDA PROLONGADA (N = 5)

Pacientes	AgsHB	AgeHB	AntiHB	ADN-HVB
1	+	-	+	-
2	+	-	+	-
3	+	-	+	-
4	+	+	-	+
5	+	-	+	-

N = Número de pacientes

En 23 niños portadores asintomáticos (tabla 3), 13 tuvieron el ADN positivos, de ellos, 5/6 (83%) eran AgeHB positivos y 8/16 (50%), habían hecho seroconversión al antígeno *e*. De 10 casos que resultaron negativos para el ADN viral, uno tenía AgeHB, 8 fueron positivos al antieHB y a un paciente no se le detectó antígeno (AgeHB), ni anticuerpo (antieHB).

Los resultados de los marcadores serológicos en niños con HAP, HCA y en portadores asintomáticos, demuestran la utilidad del método de hibridación del ADN del virus B de la hepatitis, para detectar réplica viral con gran sensibilidad y especificidad (Scotto *et al.*, 1983; Chu *et al.*, 1985).

en que estén formando anticuerpo *e* (antieHB) y que por la sensibilidad del método no sea detectado.

El hecho de haber encontrado el 50% de los niños con HCA y portadores asintomáticos con antieHB positivos, y que a la vez el 50% de los mismos tuvieran el ADN viral positivo, indica que la replicación viral continúa, lo que constituye uno de los resultados más interesantes del presente trabajo. Basado en estos criterios es posible tomar conductas terapéuticas y evitar el paso hacia otras formas de la hepatitis (cirrosis). La medida del ADN en suero es de valor en el monitoreo de pacientes que son candidatos a la terapia

Tabla 3  
RELACION DEL ADN VIRAL Y DEL SISTEMA AgeHB/antieHB EN NIÑOS PORTADORES ASINTOMATICOS DEL VIRUS B DE LA HEPATITIS (N = 23)

	ADN-HVB(+)	ADN-HVB(-)
AgeHB N = 6	5 (83%)	1 (17%)
antieHB N = 16	8 (50%)	8 (50%)
AgeHB/antieHB N = 1	0	1 (100%)

N = Número de pacientes

La mayoría de los niños AgeHB positivos (17) fueron ADN viral positivos (14), confirmando que la presencia de antígeno *e* generalmente indica replicación viral activa. Sin embargo, otros de los que tenían AgeHB positivo fueron negativos al ADN, por lo que existe la posibilidad de que se encuentren en un estadio de la enfermedad

con interferón, el cual ha sido introducido recientemente en el tratamiento de la hepatitis crónica (Dooly *et al.*, 1986).

Dos pacientes con HCA y un portador asintomático fueron negativos a los marcadores de replicación viral AgeHB, antieHB y ADN viral, lo que nos puede orientar en el caso de la HCA el paso a la

curación, y en el caso del portador asintomático, formas silentes en que aparece el virus de la hepatitis B circulante en suero, no detectado por los métodos de tercera generación. Se podría recurrir al método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el que por sensibilidad puede detectar una partícula circulante, de esta forma se podrán precisar estos períodos en que no se encuentran marcadores de replicación circulante.

De los pacientes con HAP, solamente uno mantuvo el ADN y el AgeHB positivos a los tres meses, estando en relación con la biopsia hepática.

En la figura 1 se muestra la presencia de ADN viral en muestras de sueros de pacientes. Como se observa, se logró detectar a partir de 0,5 pg.

En nuestro estudio hubo buena relación entre la presencia del ADN viral sérico y el AgeHB en todos los grupos de pacientes, lo que demuestra la utilidad clínica de la detección del ADN viral para valorar la evolución de la hepatitis.

## REFERENCIAS

- BARTOLOME, J.; I. CASTILLO; I. MORA; J. GUTIERREZ; J. C. PORRES y V. CARREÑO (1988). Different levels of hepatitis B virus replication among hepatitis B and antigen-positive chronic carrier. *Acta Virol.* 32: 193-197.
- BONINO, F.; B. HOYER; J. NELSON; R. ENGLE; G. VERME y J. GERIN (1981). Hepatitis B virus DNA in sera of HBsAg carrier. A marker of active hepatitis B virus replication. *Hepatology* 1: 386-390.

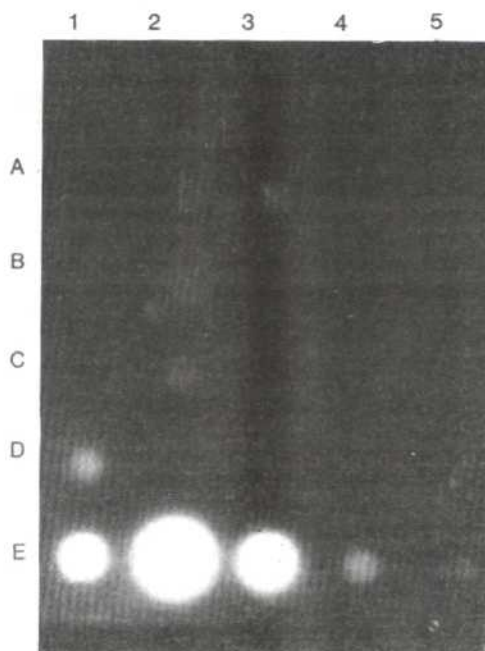


FIG. 1. HVB-ADN en suero de pacientes AgsHB positivos: A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D<sub>2</sub> y D<sub>3</sub>) muestras de ADN; D<sub>1</sub> y E<sub>1</sub>) controles positivos; A<sub>5</sub>) control negativo; E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub> y E<sub>5</sub>) 50 ng, 500 pg, 5 pg y 0,5 pg de sonda ADN. Actividad específica de la sonda: 3x10<sup>6</sup> cpm/ $\mu$ g de ADN. En el filtro 2x10<sup>6</sup> cpm/ml.

- CUNNINGHAM, M. W. y C. R. MUNDY (1987). Labelling nucleic acids for hybridization. *Nature* 326: 723-724.
- CHU, CH-M.; P. KARAYIANNIS; W. J. F. FOWLER; J. MONJARDINO; Y. F. LIAW y H. C. THOMAS (1985). Natural history of chronic hepatitis B virus infection in Taiwan. Studies of hepatitis B virus DNA in serum. *Hepatology* 5: 431-434.
- DE LA RIVA, A. G.; A. HERRERA; S. PEREZ; G. A. GRIEGO y L. HERRERA (1986). Expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en *S. cerevisiae*. *Libro de Memorias. II Seminario Cubano sobre IFN y I Seminario Cubano sobre Biotecnología*. II parte, pp. 35-40.
- DOOLY, J. S.; G. L. DAVIS y M. PETER (1986). Pilot study of recombinant human alpha interferon for chronic type B hepatitis *Gastroenterology* 90: 150-157.
- KROGSGARD, K.; P. KRYGER y J. ALBERSHILE (1985). Hepatitis virus DNA in serum from patients with acute hepatitis B. *Hepatology* 5: 10-13.
- MANIATIS, T.; J. SAMBROOK y E. F. FRISTSH (1982). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- SCOTTO, J.; M. HADCHOUEL; C. HERY; J. YUART; P. TIOLLAIS y C. BRECHOT (1983). Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: Comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 3: 279-284.
- WALTER E.; H. E. BLUM; W-B. OFFENSBERGER; C. ZESHNIGK; S. OFFENSBERGER y W. GEROK (1987). Spot blot hybridization of hepatitis B virus DNA in serum: Factors determining its sensitivity specificity. *Hepatology* 7: 557-562.