

PACIENTES Y MÉTODOS

3. PACIENTES Y MÉTODOS.

3.1. PACIENTES.

3.1.1 ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DE LA REGION DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE DEL VHB: RELACIÓN CON LAS MUTACIONES DE LA REGIÓN PRECORE Y LOS GENOTIPOS VIRALES.

Se estudiaron de forma prospectiva un total de 182 pacientes HBsAg positivo procedentes del área de Barcelona que acudieron al servicio de Hepatología del Hospital Vall d'Hebron durante los años 1999-2000. Ciento dieciséis (64%) presentaban una hepatitis crónica por el VHB y 66 (36%) eran portadores asintomáticos del VHB. Todos los pacientes fueron seguidos durante al menos un año antes de entrar en el estudio (mediana = 5.33 años, rango 1.07-22 años). Todos los casos eran negativo para los anticuerpos totales frente al VHC (anti-VHC), VHD (anti-HD) y VIH (anti-VIH). Ninguno de los pacientes incluido en este estudio había recibido previamente terapia antiviral o inmunosupresora. A 56 (31%) de los pacientes se les había practicado una punción biopsia hepática con menos de tres años de diferencia con la muestra de suero estudiada (mediana=1.3 años, rango -1.74- 2.96 años). Teniendo en cuenta la positividad del HBeAg y la evolución de la ALT durante el periodo de seguimiento los pacientes con hepatitis crónica se dividieron en tres grupos: HBeAg positivo con ALT elevada, HBeAg negativo con ALT elevada y HBeAg negativo con ALT fluctuante.

3.1.1.1. Hepatitis crónica HBeAg positivo y ALT elevada.

Este grupo estaba constituido por 30 pacientes, 6 mujeres y 24 hombres, con edades comprendidas entre los 19 y los 70 años (mediana = 42 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 2.8 años (1.5-17 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 102 UI/L (48-750 UI/L). La punción biopsia hepática se practicó en 16 (53%) casos, 14 (88%) presentaban lesiones de HCA y 2 (12%) de CH.

3.1.1.2. Hepatitis crónica HBeAg negativo y ALT elevada.

Este grupo estaba constituido por 58 pacientes, 12 mujeres y 46 hombres, con edades comprendidas entre los 21 y los 69 años (mediana=45 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 6.9 años (1.07-18 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 93 UI/L (50-425 UI/L). La punción biopsia hepática se practicó en 34 (59%) de los casos, 24 (71%) presentaban lesiones de HCA y 10 (29%) de CH.

3.1.1.3. Hepatitis crónica HBeAg negativo con ALT fluctuante.

Este grupo estaba constituido por 28 pacientes, 8 mujeres y 20 hombres, con edades comprendidas entre los 21 y los 74 años (mediana=42 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 9.2 años (2-15 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 36 UI/L (16-367 UI/L). La punción biopsia hepática se practicó en 6 (33%) casos, los cuales presentaban lesiones de HCA.

3.1.1.4. Portadores asintomáticos del HBsAg, HBeAg negativo.

Este grupo estaba constituido por 66 pacientes, 37 mujeres y 29 hombres, con edades comprendidas entre los 20 y los 64 años (mediana=42 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 8.3 años (3-22 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 22 UI/L (19-41 UI/L).

3.1.2. VALORACIÓN DE LA REPLICACIÓN DE LOS VHB Y VHC EN LA COINFECCIÓN POR EL VHB, VHC Y/O VHD. RELACIÓN CON LA DETECCIÓN DE MUTACIONES EN LAS REGIONES DEL PROMOTOR BÁSICO DEL GEN PRECORE-CORE Y DEL PRECORE DEL VHB.

Se estudiaron de forma prospectiva 65 (37%) pacientes con hepatitis crónica con coinfección por el VHB, el VHC y/o el VHD. Como grupo control se utilizaron 110 (63%) pacientes con hepatitis crónica: 55 (31%) con infección por el VHB y 55 (31%) con infección por el VHC. Todos los pacientes procedían del área de Barcelona y acudieron al servicio de Hepatología del Hospital Vall d'Hebron durante el año 1999. Dieciséis (25%) de los 65 pacientes eran anti-VIH positivo, ninguno de ellos presentaba evidencias clínicas de esta infección, considerándose inmunocompetentes. Cada paciente con coinfección se emparejó por edad, sexo, tiempo de infección conocido y estadio HBeAg, con un paciente de cada grupo control correspondiente.

3.1.2.1. Pacientes con coinfección por el VHB, VHC y/o VHD.

Este grupo estaba constituido por 65 pacientes afectados de hepatitis crónica, HBsAg positivo, que acudieron al hospital durante el año 1999. El diagnóstico de hepatitis crónica se realizó por la elevación persistente de la ALT por un periodo superior a seis meses y/o la presencia de lesión hepática en el examen histólogo. El diagnóstico de infección crónica por el VHB se basó en la positividad del HBsAg por un periodo superior a seis meses. El diagnóstico de infección crónica por el VHC se realizó por la positividad de los anti-VHC y el de infección crónica por el VHD se basó en la positividad de los anti-HD. El diagnóstico de coinfección se basó en la positividad de los marcadores serológicos de los diferentes virus.

3.1.2.1.1. Pacientes con coinfección por el VHB y VHC.

Este grupo estaba constituido por 25 pacientes HBsAg positivo, anti-VHC positivo, anti-HD negativo, 15 hombres y 10 mujeres, con edades comprendida entre los 23 y 56 años (mediana= 51 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 8.2 años (2-36 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 79 UI/L (19-220 UI/L). Cinco casos eran adictos a drogas por vía parenteral y dos de ellos presentaban anticuerpos anti-VIH, pero estaban clínicamente asintomáticos.

3.1.2.1.2. Pacientes con coinfección por el VHB y VHD.

Este grupo estaba constituido por 18 pacientes HBsAg positivo, anti-VHC negativo, anti-HD positivo, 11 hombres y 7 mujeres, con edades comprendidas entre los 18 y los 50 años (mediana= 38 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 7 años (1-17 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 57 UI/L (25-250 UI/L). Tres pacientes eran adictos a drogas por vía parenteral. En dos casos se detectaron anti-VIH, pero estaban clínicamente asintomáticos para esta infección.

3.1.2.1.3. Pacientes con coinfección por el VHB, VHC y VHD.

Este grupo estaba constituido por 22 pacientes HBsAg positivo, anti-VHC positivo, anti-HD positivo, 13 hombres y 9 mujeres, con edades comprendidas entre los 26 y 53 años (mediana= 40 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 13 años (1-23 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 89 UI/L (21-178 UI/L). Catorce pacientes eran adictos a drogas por vía parenteral. En doce casos se detectaron anti-VIH, siendo todos clínicamente asintomáticos para esta infección.

3.1.2.2. Pacientes con infección crónica aislada por el VHB o por VHC.

Se incluyeron un total de 110 pacientes con hepatitis crónica: 55 (31%) con infección por el VHB y 55 con infección por el VHC (31%), que acudieron de manera consecutiva a nuestro hospital durante el año 1999.

3.1.2.2.1. Pacientes con infección crónica por el VHB.

Este grupo estaba constituido por 55 pacientes HBsAg positivo, anti-VHC negativo y anti-HD negativo, 30 hombres y 25 mujeres, con edades comprendidas entre los 20 y los 60 años (mediana=45 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHB hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 9.8 años (1-37 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 85 UI/L (32-397 UI/L). Ningún paciente tenía historia previa de drogadicción, siendo todos anti-VIH negativo.

3.1.2.2.2. Pacientes con infección crónica por el VHC.

Este grupo estaba constituido por 55 pacientes HBsAg negativo, anti-VHC positivo y anti-HD negativo, 29 hombres y 26 mujeres, con edades comprendidas entre los 18 y los 54 años (mediana=34 años). La mediana del tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la infección por el VHC hasta el momento de la inclusión en el estudio fue de 5.3 años (1-23 años). La mediana de la concentración de ALT fue de 79 UI/L (11-241 UI/L). Cuatro eran adictos a drogas por vía parenteral, en un caso se detectaron anticuerpos anti-VIH.

3.2. MÉTODOS.

3.2.1. MARCADORES SEROLÓGICOS.

HBsAg.

La determinación del HBsAg se realizó utilizando una técnica de enzima inmunoensayo (EIA) (Abbot-Auszyme Mc. Laboratories, North Chicago, IL USA) en el autoanalizador ARCHITET™ system (Abbot). Este método consiste en un EIA en dos pasos que utiliza la tecnología de inmunoensayo con micropartículas quimioluminiscentes. En un primer paso se incuba la muestra con micropartículas recubiertas de anti-HBs que se unen al HBsAg. En un segundo paso se añade un conjugado de anti-HBs marcado con acridinio que se une al complejo antígeno/anticuerpo. La reacción se visualiza añadiendo en primer lugar peróxido de hidrógeno, que separa el colorante acridinio del complejo inmune, y a continuación NaOH, con lo que el acridinio se oxida y se forma N-metilacridinio que emite luz al volver a su estado básico.

HBeAg.

La determinación cualitativa del HBeAg se llevó a cabo mediante una técnica de radioinmunoensayo (RIA) (HBeAg/anti-HBe DiaSorin, Vercelly. Italy). Se trata de un método tipo “sandwich” directo y no competitivo, que utiliza esferas de poliestireno recubiertas de anti-HBe monoclonal a las que se une, después de una incubación, el HBeAg de la muestra. En una segunda fase se incuban las esferas con anti-HBe marcado con I¹²⁵. La cantidad de anti-HBe marcado unido a las esferas es proporcional a la concentración de HBeAg presente en la muestra.

Cuantificación del HBeAg.

Se realizó mediante la misma técnica de RIA utilizada para la determinación cualitativa del HBeAg (HBeAg/anti-HBe DiaSorin, Vercelly. Italy). Como estándar se utilizó una muestra sérica HBeAg positivo valorada por el Instituto Paul Ehrlich (Springe, Germany). Los resultados se expresan en unidades Paul Enrich/mL (UPE/mL). Mediante diluciones seriadas de este estándar con un pool de sueros HBsAg negativo se realizó una recta de calibración con los siguientes puntos: 40 UPE/mL, 20 UPE/mL, 10 UPE/mL, 5 UPE/mL, 2.5 UPE/mL, 1.25 UPE/mL, 0.625 UPE/mL. Las muestras con concentraciones de HBeAg superiores a 40 UPE/mL se diluyeron en el pool HBsAg negativo y se procesaron de nuevo.

Anti-HBe.

La determinación del anti-HBe se llevó a cabo mediante una técnica de RIA (HBeAg/anti-HBe DiaSorin, Vercelly. Italy). Este método se basa en un principio de competencia entre el anti-HBe presente en la muestra y el que recubre las esferas de poliestireno para unirse a una cantidad estandarizada de HBeAg recombinante. La cantidad de HBeAg recombinante unida a las esferas decrecerá progresivamente a medida que aumente la concentración de anti-HBe de la muestra. En la fase siguiente se

añade anti-HBe marcado con I^{125} . La cantidad de anti-HBe marcado unido a las esferas es inversamente proporcional a la cantidad de anti-HBe de la muestra.

Anti-VHC.

La determinación de anti-VHC se realizó utilizando un EIA comercial (Johnson & Johnson, Rochester, USA) en el autoanalizador Vitros System Immunodiagnosics (Ortho-Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson, Rochester, USA). En una primera fase, el anti-VHC presente en la muestra se fija a los antígenos recombinantes (c22-3, c200 y NS-5) que recubren los pocillos. En una segunda fase se incubaba con anti-IgG humana de ratón conjugada con peroxidasa de rábano (HRP). Se añaden a los pocillos substratos luminogénicos (un derivado de luminol y una sal perácida) y un agente de transferencia de electrones. La HRP cataliza la oxidación del derivado del luminol y produce una señal luminiscente que es leída por el sistema Vitros. La señal emitida es proporcional a la cantidad de HRP fijado y ésta al nivel de anti-VHC presente.

Anti-HD.

La determinación del anti-HD se llevó a cabo mediante una técnica de RIA competitivo (Anti-HD DiaSorin, Vercelly, Italy). En este método las esferas de poliestireno están recubiertas con antígeno delta (HDAg) y se incuban con la muestra de suero problema y ^{125}I -IgG anti-HD (anti-HD marcado radioactivamente). El anticuerpo marcado competirá con el anti-HD de la muestra para unirse con el HDAg de las esferas. La radioactividad retenida en la esfera es inversamente proporcional a la concentración de anti-HD de la muestra.

Anti-HIV.

Se determinaron mediante un EIA comercial (HIV-1/HIV-2, Abbot). Los resultados positivos se confirmaron mediante western blot.

3.2.2. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE ADN-VHB.

El estudio de ADN-VHB se ha efectuado a dos niveles: estudio de la presencia y de la concentración del genoma, como marcador de replicación viral, y estudio de la secuencia de nucleótidos del ADN-VHB para la determinación de las variantes virales. En estos análisis se han empleado técnicas de: doble PCR para la detección de ADN-VHB, PCR a tiempo-real para la cuantificación y técnicas de secuenciación automática a partir de fragmentos PCR para el estudio de las variantes de las regiones del PBC y del precore del VHB y para la diferenciación de los genotipos virales.

3.2.2.1 Detección del ADN-VHB.

La detección de ADN-VHB se ha realizado mediante una técnica de doble PCR que consta de las siguientes fases:

3.2.2.1.1. Extracción del ADN-VHB a partir de muestras de suero.

La extracción del ADN-VHB se realizó utilizando el "kit" QIAamp DNA mini columns (Qiagen Ltd, Sussex UK), según el procedimiento indicado a continuación. Dosecientos μ L de suero de paciente se incubaron con 20 μ L de proteinasa K (GIBCOBRL[®]) y 200 μ L de tampón de lisis durante 10 minutos a 56°C. A continuación se añadieron 200 μ L de etanol absoluto y la mezcla se depositó en una columna en cuya base se encuentra una membrana de sílica-gel porosa que tiene afinidad por los ácidos nucleicos. La columna se colocó en un tubo de plástico, se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm. El eluido se descartó y la columna se lavó para eliminar los contaminantes residuales. A continuación se eluyó añadiendo 50 μ L de agua destilada. Posteriormente las muestras se guardaron a -20°C.

3.2.2.1.2. Amplificación del ADN-VHB.

Se realizó mediante una técnica de doble PCR descrita previamente (Rodríguez y col., 1995) utilizando los cebadores siguientes:

Cp311: 5'-GCA TGG AGA CCA CCG TGA AC-3' (nt: 1606-1626)

Cp211: 5'-TGT TCC CAA GAA TAT GGT GA-3' (nt: 2842-2819)

Cp31: 5'-GTT TAA AGA CTG GGA GGA GTT GGG G-3' (nt: 1721-1745)

Cp21: 5'-CCT GAT AAA GAT TGC CAC CTT ATG A-3' (nt: 2496-2472)

Los primers Cp21 y Cp31 son internos.

Para la amplificación del ADN-VHB por primera PCR se utilizó la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen (μL) /reacción	Concentración final
Agua	30.75	
Tampón PCR x10	5	1x (Tris/ClH 10 mM; pH 8.3; ClK 50 mM; MgCl ₂ 1.5 mM)
dNTPs (1.25 mM: dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	8	0.2 mM
Cebador Cp311 (10 μM)	0.5	0.1 μM
Cebador Cp211 (10 μM)	0.5	0.1 μM
Taq ADN polimerasa (5 U/ μL)	0.25	0.025 U/ μL
Volumen de la mezcla	45	
Volumen ADN	5	
Volumen final	50	

La reacción de PCR se realizó en un termociclador PE 9600 (Perkin Elmer) en las siguientes condiciones:

-Desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C

-35 ciclos formados por las siguientes etapas:

Desnaturalización: 45 segundos a 94°C

Hibridación de los cebadores: 30 segundos a 54°C

Extensión de la cadena: 1 minuto a 72°C

-Elongación final: 3 minutos a 72°C

El fragmento amplificado en este proceso de primera PCR era de 1214 pb

La mezcla de reacción utilizada en la segunda PCR fue la siguiente:

Reactivo	Volumen (μL) /reacción	Concentración final
Agua	33.75	
Tampón PCR x10	5	1x (Tris/ClH 10 mM; pH 8.3; ClK 50 mM; MgCl ₂ 1.5 mM;)
dNTPs (1.25 mM): dATP, dGTP, dCTP, dTTP	8	0.2 mM
Cebador Cp31 (10 μM)	0.5	0.1 μM
Cebador Cp21 (10 μM)	0.5	0.1 μM
Taq ADN polimerasa (5U/ μL)	0.25	0.025 U/ μL
Volumen de la mezcla	48	
Volumen de la 1ª PCR	2	
Volumen final	50	

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

-Desnaturalización inicial: 1 minuto a 94°C

-25 ciclos formados por las siguientes etapas:

Desnaturalización: 15 segundos a 94°C

Hibridación de los cebadores: 15 segundos a 55°C

Extensión de la cadena: 1 minuto a 72°C

-Elongación final: 3 minutos a 72°C

El fragmento amplificado en el proceso de segunda PCR era de 752 pb.

La sensibilidad de la técnica final del proceso de doble PCR es de 10³ copias ADN-VHB/mL.

3.2.2.2. Cuantificación del ADN-VHB mediante PCR en tiempo real.

Esta determinación se llevó a cabo con el analizador LightCycler System (Roche Molecular Biochemicals), mediante una técnica descrita previamente (Jardi y col., 2001). Este ensayo se basa en la utilización de dos sondas marcadas con distintos fluorocromos: una sonda donadora de energía marcada en el extremo 3' con fluoresceína y una aceptora de energía marcada en el extremo 5' con LC Red 640. Estas sondas hibridan con la secuencia diana del fragmento amplificado, de tal manera que los dos fluorocromos quedan muy próximos (1-5 nucleótidos de distancia). El fluorocromo de la sonda donadora marcada con fluoresceína se excita con la luz emitida por un diodo incorporado al analizador, el cual tiene un máximo de emisión a 470 nm. La sonda donadora excitada por el diodo emite a una longitud de onda ligeramente superior a la de excitación. Cuando la sonda aceptora marcada con LC Red 640 se encuentra a una distancia de 1 a 5 nucleótidos de la donadora marcada con fluoresceína, la energía emitida por esta última excita el fluorocromo de la primera, la cual emite a 640 nm. La intensidad de la radiación emitida por el LC Red 640 se mide en uno de los detectores del analizador al final de cada fase de hibridación de los cebadores, que es el punto en que la cantidad de señal fluorescente emitida será la máxima. La intensidad de la señal será directamente proporcional a la cantidad de ADN generado en el proceso de la PCR. Al aumentar la temperatura, para pasar a la etapa elongación, las sondas se separan de las posiciones a las que estaban unidas.

El sistema de detección analiza la intensidad de la radiación emitida a 640 nm y también el ciclo de la reacción a partir del que la fluorescencia aumenta de forma lineal y se puede distinguir del ruido de fondo (ciclo inicial). Este ciclo se alcanzará antes a mayor sea la cantidad de moléculas diana presentes en la reacción. Si se dispone de un patrón con un número de copias conocido, se puede crear una curva estándar con concentraciones conocidas del ADN diana, el logaritmo de las cuales se relacionará con el ciclo a partir del que la emisión crece de manera lineal. La cuantificación de las muestras problema se hará interpolando su ciclo inicial en la curva estándar.

En este estudio para realizar la curva de calibración se utilizó un estándar sérico de 4.4×10^9 copias de ADN-VHB/mL (HBV-DNA Quantiplex Chiron. Fernwald, Germany) a partir del cual se prepararon por dilución en un suero negativo 6 puntos que cubrían desde las 10^3 copias ADN-VHB/mL hasta 10^8 copias ADN-VHB/mL.

La secuencia de los cebadores y de las sondas utilizados fueron las siguientes:

HBVF: 5'-GAC CAC CAA ATG CCC CTA T-3' (nts: 2299-2317)

HBVR: 5'-CGA GAT TGA GAT CTT CTG CGA C-3' (nts: 2442-2421)

HBVLC: 5'-T*CC CTC GCC TGC CAG ACG (A/C)AG (A/G)TC TC-3' (nts: 2386-2411)

HBVFL: 5'GA(G/C)GCAGGTCCCCTAGAAGAAGAA**-3' (nts: 2361-2384)

* LightCycler red fluorophore (LC640). ** Fluoresceína

Para cuantificar el ADN-VHB se utilizó la siguiente mezcla de reacción:

Reactivo	Volumen (µL) /reacción	Concentración final
Agua	4	
MgCl ₂ (25 mM)	2.4	3 mM
Sonda donadora HBVFL (20 µM)	0.2	0.2 µM
Sonda aceptora HBVLC (20 µM)	0.2	0.2 µM
Cebador HBVF (100 µM)	0.1	0.5 µM
Cebador HBVR (100 µM)	0.1	0.5 µM
Uracil DNAGlicosilasa	1	
Mix*	2	
Volumen de la mezcla	10	
Volumen de muestra	10	
Volumen final	20	

*LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization probes mix (Roche Diagnostics)

Las condiciones de la reacción en el analizador LightCycler fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial: 94°C durante 10 segundos

45 ciclos compuestos de las siguientes etapas:

Desnaturalización: 0 segundos a 92°C

Hibridación de los cebadores: 10 segundos a 50°C

Extensión de la cadena: 10 segundos a 72°C

La sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real se determinó mediante diluciones de concentración conocida preparadas a partir del estándar sérico antes descrito. La detección mínima se estimó en las 10^3 copias ADN-VHB/mL y el rango dinámico de la técnica fue desde 10^3 hasta 10^8 copias ADN-VHB/mL. Los coeficientes de variación intraserials para dos muestras con concentraciones de 10^5 y 10^7 fueron de un 4% y un 2%, respectivamente, y los coeficientes de variación interserials fueron de un 6% y un 5%.

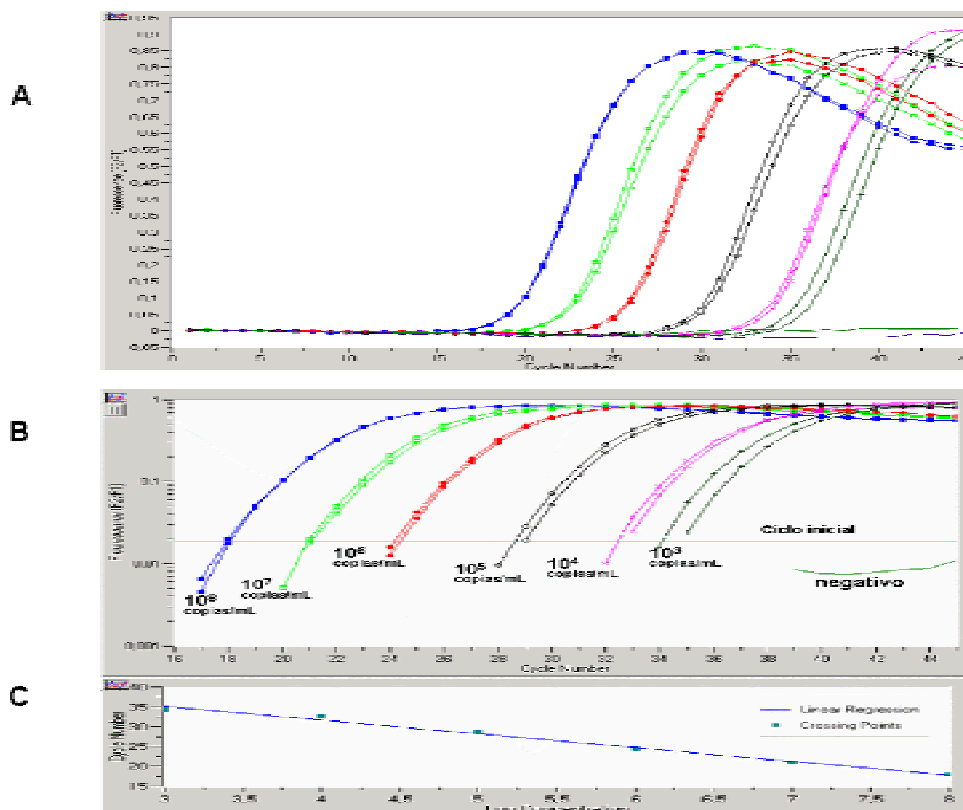


Figura 1. Recta de calibración obtenida con la técnica de PCR en tiempo real en el analizador LightCycler. A: Proceso de amplificación. B: Cálculo del ciclo inicial. C: Recta de calibración.

3.2.2.3. Determinación del genotipo del VHB e identificación de las mutaciones en las regiones del PBC y de la región del precore del VHB.

Para la determinación del genotipo del VHB e identificación de las mutaciones en las regiones del PBC y del precore se siguió un método descrito previamente (Rodríguez y col., 1995) en el que el fragmento amplificado con la técnica de detección de ADN, anteriormente descrita (ver Métodos 3.2.2.1.2.), se procesó de la siguiente manera:

3.2.2.3.1. Purificación del fragmento amplificado por PCR.

Para la purificación del fragmento amplificado por PCR se utilizó el "kit" High Pure™ PCR Product Purification Kit (Boehringer Mannheim). La purificación se basa en la unión selectiva, en presencia de sales caotrópicas, del ADN amplificado por PCR a unas fibras de vidrio especiales empaquetadas en columnas. De esta manera se eliminan del producto de PCR los cebadores, en general fragmentos pequeños de ADN < 100 pb, y otros contaminantes como: sales, nucleótidos no incorporados y proteínas (polimerasa termoestable).

Posteriormente, en primer lugar un volumen de producto de PCR se mezcló bien con cinco volúmenes de tampón de unión (tiocianato de guanidinio 3M, Tris-ClH 3mM, 5% etanol v/v, pH 6.6). Esta mezcla se depositó en una columna de propileno en cuya base se encuentran dos capas de lanas de fibra de vidrio empaquetadas, se centrifugó, se lavó dos veces con solución de lavado (etanol 80% v/v, ClNa 20mM, 2

mM Tris-ClH, pH 7.5) para eliminar los contaminantes y finalmente se eluyó en 50 µL de Tris-ClH 1 mM, pH 8.5. Este eluido se cargó en un gel de agarosa 1.5% teñido con bromuro de etidio para comprobar el proceso.

3.2.2.3.2. *Secuenciación del producto purificado.*

Para la secuenciación del producto purificado se utilizó el “kit” de secuenciación ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing, Perkin Elmer. Warrington Great Britain. Los cebadores usados fueron los siguientes: Cp5 (5'-GGA AAG AAG TCA GAA GGC AA-3' ; nts 1974-1955) para la secuenciación en dirección 5' y los cebadores Cp311 o Cp31 para la secuenciación en dirección 3'.

La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

Reactivo	Volumen (µL) /reacción	Concentración final
d Rhodamine Terminator Cycle Sequencing Read Reaction (1)	4	
Cebador (1.67 µM)	1	0.167 µM
Volumen de la mezcla	5	
Volumen de PCR purificado	5	
Volumen final	10	

(1)"DNA SEQUENCING KIT" de "Perkin Elmer Applied Biosystems".

La reacción se realizó en un termociclador PE 9600 (Perkin Elmer) en las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial: 2 minuto a 94°C

25 ciclos de que comprendía las fases siguientes:

Desnaturalización: 10 segundos a 96°C

Hibridación del cebador: 5 segundos a 50°C

Extensión de la cadena: 4 minutos a 60°C

3.2.2.2.3. *Precipitación del producto de la reacción de secuenciación.*

Una vez realizada la reacción de secuenciación, los 10 µL del producto de esta reacción se pasaron a un tubo de 1.5 mL y se precipitaron con 74 µL de una solución de EtOH 70%, Cl₂Mg 0.5 mM (1000:1) durante 15' a temperatura ambiente, se centrifugó a 14000 rpm 20', se eliminó el sobrenadante por aspiración y se secó durante 10' en una estufa a 37°C.

3.2.2.2.4. *Preparación de las secuencias.*

El precipitado obtenido en el proceso anterior se resuspendió en 15 µL de “Template Suppression Reagent”, una solución con formamida, (ABI PRISM, Perkin Elmer), durante 15' a temperatura ambiente, 3' a 100°C, 5' en hielo, seguido de pulso de centrifuga, “vórtex” y pulso de centrifuga. Los 15 µL se pasaron a un tubo de secuenciación de 0.6 mL, se taparon y se cargaron en el secuenciador automático (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Applied Biosystems).

El fragmento secuenciado es de unas 480 pb cuando se secuencia el producto de la primera PCR y de unas 250 pb cuando se secuencia el producto de la doble PCR (ver Figura 13).

La identificación de mutaciones en las zonas del PBC y del precore se realizó alineando las secuencias obtenidas con 47 secuencias completas obtenidas del Gene Bank. El genotipo del VHB se estableció alineando las secuencias obtenidas con 47 secuencias completas obtenidas del Gene Bank correspondientes a los 6 genotipos descritos (7 secuencias del genotipo A, 11 del genotipo B, 15 del C, 8 del D, 3 del E y 3 del F).

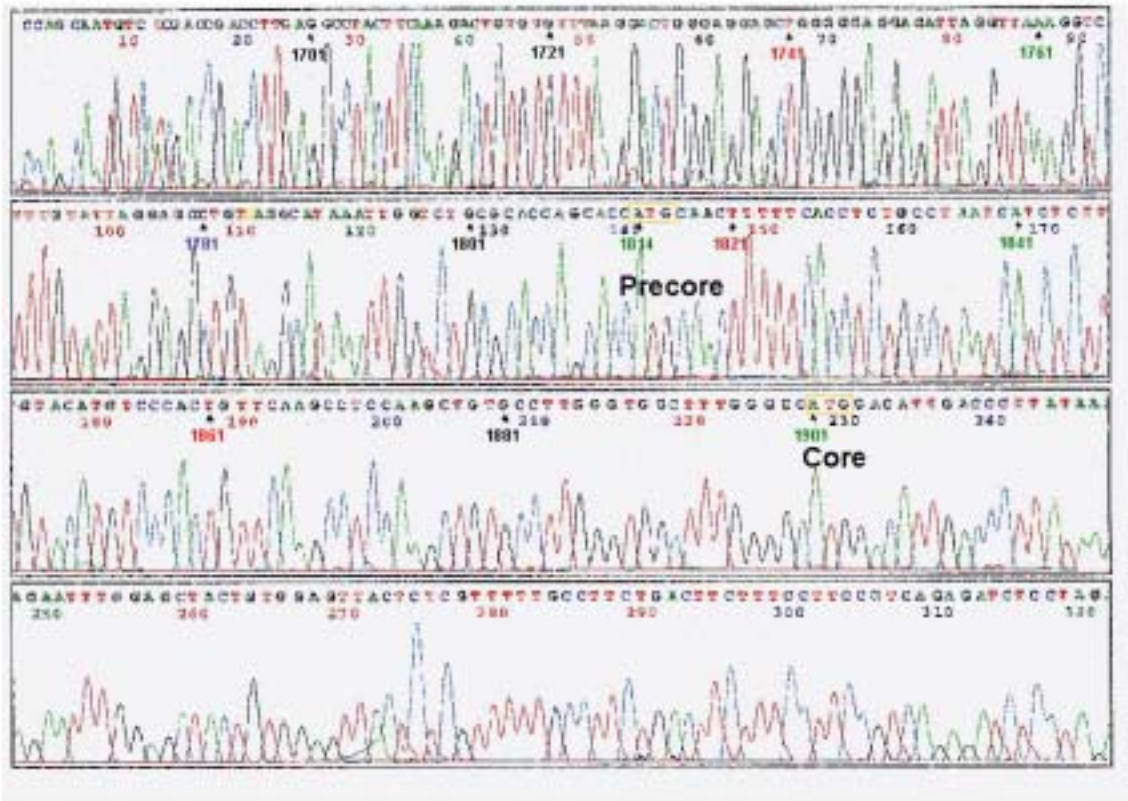


Figura 2. Resultado de la secuenciación del PBC y el precore del gen precore-core del VHB.

3.2.3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DEL ARN-VHC.

El estudio de ARN-VHC se efectuó a dos niveles: estudio de la presencia y de la concentración del genoma, como marcador de replicación viral mediante un método de doble PCR, y estudio de los diferentes genotipos mediante PCR e hibridación con sondas específicas

3.2.3.1. Detección del ARN-VHC.

La técnica de detección de ARN-VHC consta de los apartados que a continuación se describen:

3.2.3.1.1. Extracción del ARN del VHC a partir de muestras de suero.

La extracción se realizó utilizando el “kit” QIAamp Viral ARN (Qiagen Ltd. Sussex UK). Básicamente, 140 μ L de suero se incubaron con 560 μ L de una solución de lisis durante 10 minutos a temperatura ambiente; esta solución es capaz de inactivar ARNasas. A continuación se añadieron 560 μ L de etanol absoluto. Posteriormente, se depositaron 630 μ L de esta solución en una columna en cuya base se encuentra una membrana de sílica-gel que absorbe el ARN viral. La columna se colocó en un tubo de plástico y se centrifugó 1 minuto a 8000 rpm. El eluido y el tubo de plástico se descartaron, y la columna se puso en un nuevo tubo de plástico. Seguidamente, se colocó en la columna el resto de la solución (aproximadamente otros 630 μ L) y se repitió la misma operación. Después de dos lavados con solución tamponada, el ARN se eluyó de la columna añadiendo 60 μ L de solución de elución (agua libre de ARNasas y con 0.04 % de azida sódica que previene el crecimiento bacteriano y la subsecuente contaminación con ARNasas). La columna se incubó con la solución de elución 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 8000 rpm un minuto. Las muestras se guardaron a -80°C .

3.2.3.1.2. Amplificación del ARN-VHC.

Se realizó mediante una técnica de retrotranscripción y doble PCR (RT-PCR) en la que los cebadores hibridan con la región 5' no codificante del ARN viral.

Las secuencias de los cebadores utilizados fueron los siguientes:

1CH: 5'-GGT GCA CGG TCT ACG AGA CCT C-3'

2CH: 5'-AAC TAC TGT CTT CAC GCA GAA-3'

ITS: 5'- GCG ACC CAA CAC TAC TCG GCT-3'

4CH: 5'- ATG GCG TTA GTA TGA GTG-3'

La mezcla de reacción utilizada en la RT-PCR fue:

Reactivo	Volumen (μL) /reacción	Concentración final
Agua	12.25	
Tampón PCR x10	2.5	1x (Tris/ClH 10 mM; pH 8.3; ClK 50 mM; MgCl_2 1.5 mM;)
dNTPs (2.5 mM): dATP, dGTP, dCTP, dTTP	2	0.2 mM
RNAsin 40 U/ μL	0.5	0.02 U/ μL
Cebador 1CH (10 μM)	1.25	0.5 μM
Cebador 2CH (10 μM)	1.25	0.5 μM
AMV 25 U/ μL	0.125	0.125 U/ μL
Taq ADN polimerasa (5U/ μL)	0.25	0.025 U/ μL
Volumen de la mezcla	20	
Volumen ARN	5	
Volumen final	25	

La reacción de RT-PCR se realizó en un termociclador PE 9600 (Perkin Elmer) en las siguientes condiciones:

Retrotranscripción: 15 minutos a 42°C

Desnaturalización inicial: 3 minutos a 95°C

34 ciclos de que comprendían los pasos siguientes:

Desnaturalización: 15 segundos a 94°C

Hibridación de los cebadores: 15 segundos a 54°C

Extensión de la cadena: 1 minuto a 72°C

Elongación final: 7 minutos a 72°C

El fragmento amplificado en esta primera PCR era de 289 pb

La mezcla de reacción utilizada en la segunda PCR fue:

Reactivo	Volumen (μL) /reacción	Concentración final
Agua	16.7	
Tampón PCR x10	2.5	1x (Tris/ClH 10 mM; pH 8.3; ClK 50 mM; MgCl_2 1.5 mM)
dNTPs (2.5 mM): dATP, dGTP, dCTP, dTTP	2	0.2 mM
Cebador TS (10 μM)	1.25	0.5 μM
Cebador 4CH (10 μM)	1.25	0.5 μM
Taq ADN polimerasa (5U/ μL)	0.25	0.025 U/ μL
Volumen de la mezcla	23	
Volumen de la 1ª PCR	2	
Volumen final	25	

La reacción de PCR se realizó en las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C

24 ciclos que comprendían los pasos siguientes:

Desnaturalización: 15 segundos a 94°C

Hibridación de los cebadores: 15 segundos a 45°C

Extensión de la cadena: 1 minuto a 72°C

Elongación final: 7 minutos a 72°C

El fragmento amplificado en proceso de la segunda PCR fue de 188 pb.

La sensibilidad de la técnica es de unas 10^3 copias ARN-VHC/mL.

3.2.3.2. Cuantificación del ARN-VHC.

El ARN-VHC se cuantificó en suero utilizando la técnica Amplicor HVC Monitor™ Test, versión 2.0 (HCV Monitor test Roche). Este método se basa en cinco procesos principales: preparación del espécimen, transcripción reversa del ARN diana, amplificación por PCR del cADN retrotranscrito en presencia de oligonucleótidos marcados con Biotina, hibridación del ADN amplificado con sondas oligonucleotídicas específicas y detección del ADN amplificado y ligado a la sonda por determinación colorimétrica.

La determinación cuantitativa del ARN-VHC se realizó utilizando como patrón un transcrito de ARN no infeccioso que contiene los mismos sitios de hibridación de los cebadores que el ARN-VHC y una región única de hibridación para una sonda específica (introducida por mutagénesis dirigida). Esta región permite distinguir el producto amplificado a partir del ARN patrón del producto amplificado a partir del ARN-VHC presente en la muestra. El ARN patrón, con un número de copias conocido, se incorpora dentro de cada muestra y, por lo tanto, se procesa al mismo tiempo que el ARN-VHC presente en ésta. La cuantificación del ARN patrón se efectúa en pocillos diferentes al ARN-VHC de la muestra (pocillos con sonda para el patrón y pocillos con sonda para el ARN-VHC). La concentración de ARN-VHC se determina comparando la señal de los pocillos para el ARN-VHC con la del ARN patrón para cada muestra.

El límite de detección es de 6×10^2 copias/mL y linealidad hasta 8.5×10^5 copias /mL.

3.2.3.3. Determinación de los genotipos del VHC.

El genotipado del VHC se realizó mediante RT-PCR de un fragmento correspondiente a la región del core del VHC y posterior hibridación de este fragmento amplificado con sondas oligonucleotídicas específicas de cada genotipo (HCV Genotyping DNA Enzyme Immunoassay. Dia Sorin).

Este método consta de los siguientes pasos:

3.2.3.3.1. Extracción y amplificación del ARN-VHC.

Con excepción de los cebadores, todos los procesos utilizados son los mismos que para la detección del ARN-VHC: extracción del ARN-VHC, reacción de la RT-PCR y segunda PCR. También son iguales a la detección los dos programas de amplificación (RT-PCR y segunda PCR (ver apartado Métodos 3.2.3)).

Para el genotipado se utilizaron los siguientes cebadores:

En la RT-PCR: 1AS: 5'-ATG TAC CCC ATG AGG TCG GC-3'

2S: 5'-TAG ATTGGG TGT GCG CGC GA-3'

4S: 5'-TGT GTG CGC GAC GCG TAA A-3'

En la doble PCR: 3S: 5'-CGC GCG ACT AGG AAG ACT TC-3'

5AS: 5'-GCA (CT)GT (AG)AG GGT ATC GAT GAC (CT)T-3'

3.2.3.3.2. Genotipaje VHC.

La determinación del genotipo del VHC a partir del producto amplificado en el apartado anterior se realizó mediante una técnica de DNA enzainmunoensayo (DEIA) con sondas específicas para cada genotipo (HCV Genotyping DNA Enzyme Immunoassay. Dia Sorin).

Las sondas utilizadas para la determinación fueron:

Genotipo 1a: (5'Biot) 5'-GCA ACC TCG AGG TAG ACG TC-3'

Genotipo 1b: (5'Biot) 5'-GCA ACC TCG TGG AAG GCG AC-3'

Genotipo 2: (5'Biot) 5'-GCC CAT CCC (CTG)AA AGA TCG GCG C(AT)C CAC (TC)G-3'
 Genotipo 3: (5'Biot) 5'-GCG CGT CGG AGC GAA GGC CG-3'
 Genotipo 4: (5'Biot) 5'-(AG)CC (AG)TC TTG GGG (CT)CC (AG)AA TGA TC-3'
 Genotipo 5: (5'Biot) 5'-GCA ACC CCG TGC (AG)CG GCG CCA G-3'
 Genotipo 6: (5'Biot) 5'-CCA GCC CAG AGG CAG GCG CCA A -3'

En primer lugar, dos días antes de realizar el DEIA se ligan las sondas marcadas con Biotina a la estreptavidina fijada a una microplaca. Para ello se ponen 100 µL de sonda en cada pocillo (7 por paciente), se tapa la microplaca y se incuba a 4°C toda la noche. Al finalizar la incubación se lava la microplaca con el reactivo de lavado para continuar con el siguiente proceso. En primer lugar se procede a desnaturalizar los productos de la PCR mediante calentamiento a 100°C durante 10 minutos y posterior enfriamiento en un baño de hielo. A continuación se añaden 100 µL de solución de hibridación a cada uno de los pocillos de la placa con las sondas ligadas. Seguidamente se añaden 4 µL del producto desnaturalizado de la PCR. Se tapan los pocillos y se incuba durante 90 minutos a 55°C. Al finalizar la incubación se lavan las tiras y se añaden 200 µL de solución de lavado, previamente calentada a 55°C, durante 30 minutos, se lavan de nuevo las tiras, se ponen 100 µL de la solución de anticuerpos anti-DNA a cada uno de los pocillos, se tapan y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se lava de nuevo. A continuación se añaden a cada uno de los pocillos 100 µL de la solución de marcador enzimático. Se tapan las placas y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente. Se lava y se añaden 100 µL de la mezcla cromógeno/ sustrato a cada uno de los pocillos. Se incuba a oscuras durante 30 minutos, se añaden 200 µL de la solución de bloqueo y se lee la absorbancia a 450 nm. Los pocillos que presenten una absorbancia por encima del blanco serán considerados positivos y se corresponderán al genotipo de la muestra.

3.2.3. TÉCNICAS DE ESTUDIO DE ARN-VHD.

El estudio de ARN-VHD se ha efectuado a dos niveles: Estudio de la detección de ARN-VHD, como marcador de replicación viral, mediante una técnica de doble PCR, y estudio de la secuencia de nucleótidos del ARN-VHD, mediante secuenciación, para el análisis de los genotipos virales.

3.2.3.1. Detección y genotipado del ARN-VHD.

3.2.3.1.1. Extracción del ARN-VHD.

Se realizó a partir de muestras de suero siguiendo el mismo método descrito para la extracción del ADN-VHB (Métodos, apartado 3.2.2.1.).

3.2.3.1.2. Detección del ARN-VHD.

Se realizó mediante RT-PCR precedida de una fase inicial de desnaturalización y choque térmico.

Los cebadores utilizados fueron:

Dp 11: 3'-AAT GGA CTA CCG GCC GTA CCA G-5'

Dp 14: 5'-CTC AGA GGG AGG AAT CCA CTC GG-3'

La desnaturalización se efectuó incubando durante 5 minutos a 100°C la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen (µL) /reacción	Concentración final
Cebador inverso Dp11 (10µM)	1	0.91 µM
dNTPs (2.5 mM): dATP, dGTP, dCTP, dTTP	8	1.8 mM
Volumen de la mezcla	9	
Volumen de ARN-VHD	2	
Volumen final	11	

Transcurridos los cinco minutos de desnaturalización se coloca en etanol absoluto enfriado a -80°C. Sobre la mezcla enfriada se añade el resto de componentes de la retrotranscripción, quedando finalmente, en cada tubo, la siguiente mezcla:

Reactivo	Volumen (μL) /reacción	Concentración final
Agua	4.4	
Tampón 5X AMV RT	4	1x (Tris/ClH 50 mM; pH 8.5; ClK 30 mM; MgCl_2 8 mM; Ditiotreitól 1 mM)
Cebador inverso Dp11 (10 μM)	0	0.5 μM
dNTPs (2.5 mM): dATP, dGTP, dCTP, dTTP	0	1 mM
RNAsin (10 U/ μL)	0.5	0.25 U/ μL
RT AMV (25 UI/ μL)	0.1	0.125 UI/ μL
Volumen de la mezcla	9	
Volumen de mezcla ARN-VHD desnaturalizado	11	
Volumen final	20	

El programa para la retrotranscripción fue de 45 minutos a 45°C seguido de 5 minutos a 94°C. Para la amplificación por PCR se utilizó la siguiente mezcla de reacción que se añade al total de la anterior reacción:

Reactivo	Volumen (μL) /reacción	Concentración final
Agua	70.5	
Tampón PCR 10X	8	*(Tris/ClH 13 mM; pH 8.4; ClK 46 mM; MgCl_2 2.8 mM; Ditiotreitól 0.2 mM)
Cebador directo Dp14 (10 μM)	1	0.1 μM
Taq ADN polimerasa (5U/ μL)	0.25	0.025 U/ μL
Volumen de la mezcla	80	
Volumen retrotranscripción	20	
Volumen final	100	

*Concentraciones resultantes de la mezcla del tampón 10x con el tampón 5X AMV RT.

El programa utilizado fue:
 Desnaturalización inicial: 4 minutos a 94°C
 35 ciclos que comprendían:
 Desnaturalización: 1 minuto a 94°C
 Hibridación: 1 minuto a 55°C
 Elongación: 2 minutos a 72°C
 Elongación final: 3 minutos a 72°C
 El fragmento amplificado fue de 440 pb
 La sensibilidad del método fue de 1×10^4 copias del genoma VHD/mL.

3.2.3.1.3 Genotipado del ARN-VHD

Se realizó mediante secuenciación directa de productos PCR de manera similar a la descrita en el apartado del genotipado del VHB (Métodos 3.2.2.3), siguiendo un método descrito previamente por Cotrina y col. en el año 1998. Sin embargo, el protocolo utilizado para la amplificación fue el descrito en el apartado detección del ARN-VHD (Métodos 3.2.3.1)

Los cebadores utilizados en la RT-PCR fueron:
 Dp2: 5'-AGT GGC TCT CCC TTA GCC AT-3'
 Dp6: 3'-AGC CAC TTA GGA GGG GAC TC-5'
 Mediante estos cebadores se amplificó en la primera PCR un fragmento de 522 pb.

El cebador utilizado para la secuenciación fue:

Dp3: 3'-GAA GGA AGC AGC CAC TAG GA-5'

Las secuencias obtenidas se alinearon, se compararon con secuencias obtenidas del Gene Bank y se clasificaron en los genotipos I, II y III, mediante análisis filogenético.

3.2.3. METODOLOGÍA ESTADÍSTICA.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa estadístico SPSS, versión 10.0. Para la comparación de variables cualitativas se utilizaron las pruebas de ji-cuadrado (χ^2) o de Fischer cuando se trataba de un número reducido de casos. Para la comparación de variables cuantitativas, la comprobación de la normalidad de las distribuciones se realizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En los casos en que los resultados no mostraban una distribución normal, o bien cuando se trataba de un número reducido de casos, se utilizaron pruebas no paramétricas. Para la comparación de una variable cuantitativa entre más de dos grupos independientes se utilizó el análisis de la variancia o la prueba de Kruskal-Wallis. Para la comparación de una variable entre dos grupos con datos independientes se utilizaron las pruebas t de Student ó U de Mann-Whitney; para datos apareados, la prueba t para datos apareados o la T de Wilcoxon. En todas las pruebas se aceptó la existencia de significación estadística si $p < 0.05$.

Las distribuciones de los resultados para las diferentes variables cuantitativas se representan mediante diagrama de cajas ("boxplot"). En este diagrama, el intervalo que contiene el 50% de los resultados entre los percentiles 25 y 75 se representan mediante un rectángulo dividido por una línea horizontal (mediana). El resto de los resultados (excepto los valores atípicos: "outliers" y los valores extremos) se encuentran comprendidos dentro del intervalo definido por las dos líneas verticales (superior e inferior al rectángulo), limitadas por una línea horizontal cada una. Los "outliers" son aquellos valores que se desvían entre 1.5 y 3 veces la longitud de la caja, por la parte superior o inferior. Los valores extremos se desvían más de tres longitudes. En estas representaciones los "outliers" se representan con círculos y los valores extremos con asteriscos.