

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

## MÉTODO DE INMUNOCOMPLEJOS ESPECÍFICOS PARA DETECTAR ADN DEL VIRUS DE HEPATITIS B EN PACIENTES CON ANTIGENEMIAS BAJAS

*Dra. Victoria E. González Ramírez, Dra. Elsa García Castillo, Dr. Antonio González Griego, Prof. Mario Pezzella, Dra. Alina Alerm González y Dr. Jorge A. Santiesteban*

### RESUMEN

Se evaluó la influencia de las concentraciones de las partículas asociadas con el virus de hepatitis B desde el punto de vista inmunológico mediante la formación de inmunocomplejos específicos (ICE), se determinó el DNA antes y después de formado el inmunocomplejo. Se utilizaron 10 muestras serológicas de pacientes portadores crónicos con antigenemia baja (menos de 1  $\mu\text{g/mL}$ ), a las que se les realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para detección del ADN viral. A cada muestra se le aplicó la técnica de ICE mediante un estándar de anticuerpos para su formación *in vitro*, se realizó una purificación con fenol cloroformo para ser procesado por RCP. La amplificación de las muestras con inmunocomplejos demostró que la técnica de ICE poseía capacidad de concentrar el antígeno y éste pudo ser detectado cuando no era posible determinar las concentraciones en una electroforesis de agarosa.

*Descriptor DeCS:* COMPLEJO ANTIGENO-ANTICUERPO; VIRUS DE LA HEPATITIS B /inmunología; ADN VIRAL/inmunología; ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B; REACCION EN CADENA POR POLIMERASA/métodos.

Los diferentes marcadores serológicos de la infección por virus de la hepatitis B (VHB), antígenos y anticuerpos, son en general detectados en el suero de los individuos infectados. El estudio de la presencia de estos marcadores es necesario para determinar la etapa de la infección y evaluar la infectividad del paciente.<sup>1</sup> El antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB) es el primer marcador detectable en suero o plasma, tras la infección por este virus.

La mayoría de los ensayos serológicos disponibles comercialmente para el diagnóstico de infección por VHB se basan en ensayos de fase sólida del tipo inmunoensayo enzimático, hoy día se emplean métodos muy sensibles y específicos como la detección del ácido desoxi-ribonucleico (ADN) viral. Aún con estos métodos aparecen resultados falsos negativos que deben ser bien valorados, con el objetivo de efectuar una eficiente clasificación inmunopidemiológica de los casos.<sup>1,2</sup>

En trabajos realizados en el Departamento de Inmunología del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" se ha podido comprobar que cuando las antigenemias son bajas disminuye en gran medida la posibilidad de detectar el ADN, independientemente de la positividad o no del resto de los marcadores. El presente trabajo tiene como propósito demostrar la influencia de concentraciones desde el punto de vista inmunológico de las partículas asociadas con el virus de hepatitis B mediante la formación de inmunocomplejos específicos (ICE), con la determinación en éstas del ADN antes y después de formado el inmunocomplejo.

## MÉTODOS

Se utilizaron 10 muestras serológicas de pacientes portadores crónicos con antigenemia baja (menos de  $1 \mu\text{g/mL}$ ), recolectadas en la consulta de hepatitis del Departamento de Inmunología de "Victoria de Girón" y evaluadas por el método serológico de *cuantificación* de AgsHB desarrollado en el departamento. A estas muestras se les realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para la detección del ADN viral. Los sueros se procesaron a una concentración 1x y 10x y al conocer el punto de equivalencia de los inmunocomplejos para este antígeno, se les aplicó la técnica de ICE mediante un estándar de anticuerpos para su formación *in vitro*; se precipitó con sulfato de amonio. La concentración de proteínas fue calculada a través de la densidad óptica del precipitado a una longitud de onda de  $280 \text{ nm}$ .<sup>3</sup> El precipitado obtenido fue resuspendido en tampón fosfato salino (PBS), se le realizó una purificación con fenol cloroformo para ser procesado por RCP; para ello se

utilizaron  $10 \mu\text{L}$  de muestra en una mezcla de reacción final de  $100 \mu\text{L}$ . Se emplearon en la amplificación cebadores que flanquean la región que codifica para la proteína S del VHB. El estudio del producto amplificado se realizó en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

## RESULTADOS

De las 10 muestras 1x y 10x evaluadas en paralelo, 50 % resultó negativo en la detección de ADN viral por RCP antes de la formación de los ICE. Después de la formación *in vitro* de éstos se reevaluaron con la técnica de RCP, se mantuvieron los mismos resultados en las 1x; cuando se revalidaron las muestras 10x se obtuvo 100 % de positividad en la detección del ADN viral. En todas las muestras positivas se amplificó un segmento de la talla esperada (440 pb).

## DISCUSIÓN

La amplificación de las muestras con inmunocomplejos demuestra que la técnica de ICE posee la capacidad de concentrar el antígeno, y éste puede ser detectado cuando se encuentra en concentraciones insuficientes para ser determinadas en una electroforesis de agarosa. Esto fue demostrado con la realización de una electroforesis capilar a las 5 muestras 1 x negativas por RCP; que resultó en todas positiva por su alta sensibilidad.

El diseño de ICE con muestras biológicas brinda la ventaja de aumentar la sensibilidad del método de detección y amplificación del ADN y debe ser utilizado como un método confirmatorio en caso de muestras con resultados discordantes entre serología y ADN.

## SUMMARY

We evaluated the influence of the concentrations of particles associated with Hepatitis B virus from the immunologic viewpoint through the formation of specific antibody-antigen complexes, and also we determined DNA before and after the formation of the complexes. We used 10 serological samples of chronic carrier patients with low antigenemia (less than  $1\mu\text{g/mL}$ ) which were subjected to PCR for detecting viral DNA. The antibody-antigen complex technique was used in each sample through standard antibodies for the complex to be formed *in vitro*, then purification with phenol chloroform to be PCR-processed. The amplification of samples with the antibody-antigen complexes showed that this technique was able to concentrate antigens, so it could be detected when it was impossible to determine antigen concentrations in an agar electrophoresis.

*Subject headings:* ANTIGEN- ANTIBODY COMPLEX; HEPATITIS B VIRUS/immunology; DNA VIRAL/IMMUNOLOGY; HEPATITIS B SURFACE ANTIGENS; POLYMERASE CHAIN REACTION/methods.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Muzio V, Pentón E. El virus de la hepatitis B. En: Padrón GJ. Bases moleculares para el estudio de hepatitis virales. La Habana: Elfos Scientiae, 1998:119-60.
2. Coppola R, Rizzetto M, Bradley DW. Viral hepatitis handbook. Italia: Sorin Biomedica, 1996:27-56.
3. García R. Immune complexes from HIV-1 patients contain infectious virus able to infect normal lymphocytes. J Allergy Clin Immunol 1996;98:1-4.

Recibido: 29 de noviembre de 1999. Aprobado: 17 de diciembre de 1999.

Dra. *Victoria E. González Ramírez*. Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 No 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.