

ANÁLISE DE ALGUNS PARÂMETROS ENVOLVIDOS COM O ENSAIO DA DNA POLIMERASE DO VÍRUS DA HEPATITE B (*)

Yuriko MIYAMOTO**
João Renato Rebello PINHO***

RIALA6/695

MIYAMOTO, Y. & PINHO, J.R.R. — Análise de alguns parâmetros envolvidos com o ensaio de DNA polimerase do vírus da hepatite B. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 50(1/2): 297-299, 1990.

RESUMO: O micrométodo para detecção da atividade da DNA polimerase do vírus da hepatite B descrito por LIN et alii² foi modificado, e realizou-se um estudo comparativo entre as duas técnicas. Além disso, foram comparados dois tipos diferentes de papel de filtro, o GF/C e o AP20. Todos os testes apresentaram resultados viáveis; ademais, pudemos verificar que a técnica de Lin modificada e o filtro AP20 mostraram maiores diferenciais, sendo recomendados para este tipo de trabalho.

DESCRITORES: DNA polimerase; vírus da hepatite B; hibridização molecular; papel de filtro com fibra de vidro.

INTRODUÇÃO

A atividade da DNA polimerase (DNAP) do vírus da hepatite B (HBV) no soro é um dos marcadores que permitem detectar a replicação viral, através da monitoração da incorporação de nucleotídeos radioativos no genoma viral. Inicialmente, o método foi descrito por KAPLAN et alii¹, que utilizavam uma etapa de ultracentrifugação no preparo das amostras. Em 1984, LIN et alii² desenvolveram um micrométodo dispensando essa etapa, e utilizando ácido fosfonofórmico (PFA) como inibidor da DNAP viral.

Em nosso laboratório, utilizamos a técnica de Lin, porém com algumas modificações, e desenvolvemos uma análise comparativa entre o nosso método e o originalmente proposto pelo autor.

Além disso, realizamos um estudo com dois tipos diferentes de papéis de filtro com fibra de vidro, o GF/C, normalmente utilizado em nossas reações, e o AP20, para teste.

Algumas das amostras haviam sido anteriormente analisadas por hibridização molecular (HBV-DNA), conforme PINHO et alii³, e também por DNAP.

MATERIAL E MÉTODOS

No estudo das duas técnicas, utilizamos oito soros anteriormente testados por HBV-DNA, dos quais seis haviam também sido analisados por DNAP, sendo um soro positivo e um negativo para essas duas técnicas, três soros com resultados discordantes (um positivo para HBV-DNA e negativo para DNAP, e dois positivos para DNAP, mas negativos para HBV-DNA), um soro duvidoso com a hibridização e negativo para DNAP, e, finalmente, um positivo e um negativo testados apenas para HBV-DNA (Tabela 2).

Os soros foram incubados a 37°C por 16 horas, em solução de reagentes, de acordo com a tabela 1.

* Realizado pelo Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz.

** Instituto de Medicina Social e de Criminologia do Estado de São Paulo.

*** Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Adolfo Lutz.

Cada amostra foi incubada em duplicata, um tubo contendo PFA e outro sem PFA. Em seguida, foram adicionados 25µl de Pronase E, para parar a reação, incubando-se 40°C por uma hora.

As amostras foram então transferidas para papéis de filtro GF/C, recortados em círculos de 25 mm de diâmetro e secos em estufa a 70°C. A seguir, os filtros foram lavados cinco vezes em TCA 5% + Pirofosfato de Sódio 50 mM por dez minutos e uma vez em etanol por quinze minutos, sob agitação. Foram novamente secos a 70°C, e colocados em 8 ml de líquido de cintilação, para contagem da radioatividade por um minuto, em contador beta. O soro é considerado positivo se apresentar uma diferença significativa entre os dois tubos.

O intervalo entre a dosagem prévia de DNAP e este ensaio foi de cerca de seis meses.

Para a comparação dos dois tipos de filtros, foram utilizados um soro positivo e outro negativo, e papéis de filtro com fibra de vidro GF/C (Whatman) e AP20 (Millipore), analisados pelo método de Lin modificado.

RESULTADOS

Em todas as amostras, obtivemos resultados concordantes nas duas técnicas de DNAP, e também com a DNAP anterior. Das duas amostras que haviam sido testadas anteriormente somente por hibridização, uma foi igualmente negativa para DNAP, e a outra discordante (negativa para DNAP, e positiva para HBV-DNA), como mostra a tabela 2.

Os dois tipos de papéis de filtro apresentaram os resultados esperados, de acordo com a tabela 3.

TABELA 1

Solução de Reagentes

REAGENTES	MÉTODO DE LIN	
	Modificado	Original
Tris HCl pH 7,6	-	77mM
Tris HCl pH 7,4	100mM	-
KCl	154mM	400mM
MgCl ₂	38mM	-
Mg (CH ₃ COO) ₂	-	2,5mM
NH ₄ Cl	57mM	-
2-Mercaptoetanol	0,14%	0,1%
Nonidet P-40	0,89%	1,0%
dNTPs (A+C+G) cada	0,1mM	0,3mM
³ H-TTP	1,5uCi	2,0uCi
PFA	2,5mM	1,0mM
Soro	50ul	25ul
Solução de reagentes	25ul	50ul

TABELA 2

Resultados dos Testes de DNAP e HBV-DNA

Soro	DNAP			HBV-DNA	
	1	2	3	1	2
1	+(532)	+(286)	+(346)	-	+++
2	N.R.	-(22)	-(28)	++	++
3	-(<0)	-(21)	-(36)	+/	-
4	-(<0)	-(48)	-(19)	+	-
5	+(846)	+(862)	+(399)	-	++++
6	N.R.	-(<0)	-(<0)	-	N.R.
7	+(646)	+(564)	+(285)	+++	N.R.
8	- (7)	- (2)	- (<0)	-	-

DNAP: 1- DNAP prévia; 2- Método de Lin modificado; 3- Método de Lin original. Os números entre parênteses indicam o diferencial: até 100 = negativo; de 100 a 200 = incorporação baixa; de 200 a 300 = incorporação moderada; acima de 300 = incorporação elevada.

HBV-DNA: 1- Hibridização anterior; 2- hibridização realizada posteriormente. O número de cruzes indica semi-quantificação da positividade (+ a ++++).

N.R.: Não realizado

TABELA 3

Comparação dos Papéis de Filtro

Soro	GF/C	AP20
+	+(4210)	+(5585)
-	- (<0)	- (14)

DISCUSSÃO

Os resultados mostram que tanto a técnica de Lin modificada como a original são viáveis, embora a DNAP prévia talvez apresente maior sensibilidade, como se nota pelos diferenciais obtidos (Tabela 1).

A discordância entre a amostra positiva para HBV-DNA e negativa para DNAP deve-se talvez à maior sensibilidade da técnica. Quanto às duas amostras negativas para hibridização, e que foram positivas para DNAP, um novo teste de HBV-DNA foi realizado, cujo resultado comprovou a positividade de ambos. A amostra duvidosa e a positiva(+) para HBV-DNA, que era negativa para DNAP, numa segunda hibridização, foi também negativa (Tabela 2).

Pudemos observar também que, após seis meses de armazenamento a -20°C, os resultados obtidos por DNAP foram praticamente os mesmos.

No teste dos dois papéis de filtro, ambos apresentaram os resultados esperados, sendo que

o filtro AP20 mostrou um diferencial maior que o GF/C.

Nossos resultados demonstram também a utilidade da realização das duas técnicas, a DNAp e o

HBV-DNA, para a monitoração da replicação do HBV, pois a detecção da atividade da DNA polimerase funciona como um eficiente controle de qualidade da técnica de hibridização, ao menos durante a padronização desta.

RIALA6/669

MIYAMOTO, Y. & PINHO, J.R.R. — Some parameters for the assay of the DNA polymerase of the hepatitis B virus. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 50 (1/2): 297-299, 1990.

ABSTRACT: The micromethod for detection of the hepatitis B virus DNA polymerase activity described by LIN et alii was modified, and a comparative study between this two techniques was performed. Besides, two different kinds of filter paper utilized in the reaction, the GF/C and the AP20, were compared. All the tests showed viable results, although the modified Lin's technique and the filter AP20 showed larger differentials.

DESCRIPTORS: DNA polymerase; hepatitis B virus; molecular hybridization;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KAPLAN, P.M.; GREENMAN, R.L.; GERIN, J.L.; PURCELL, R.H. & ROBINSON, W.S. — DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.*, 12: 995-1005, 1973.
2. LIN, H.J.; WU, P.C.; LAI, C.L. & CHAK, W. — Micromethod for phosphonoformic inhibition assay of hepatitis B viral DNA polymerase. *Clin. Chem.*, 30: 549-552, 1984.
3. PINHO, J.R.R.; FONSECA, L.E.P.; SONG Y.; MIYAMOTO, Y.; CARRILHO, F.J.; GRANATO, C.F.H. & SILVA, L.C. — Comparison of serum hepatitis B virus replication markers in chronic patients: studies on HBeAg/Anti-HBe system, viral DNA polymerase and HBV-DNA. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 31: 328-335, 1989.

Recebido para publicação em 23 de março de 1990

