

DETECCIÓN VIRUS HEPATITIS B POR PCR

Ref. PCRVHB (4 prácticas)

1. OBJETIVO DEL EXPERIMENTO

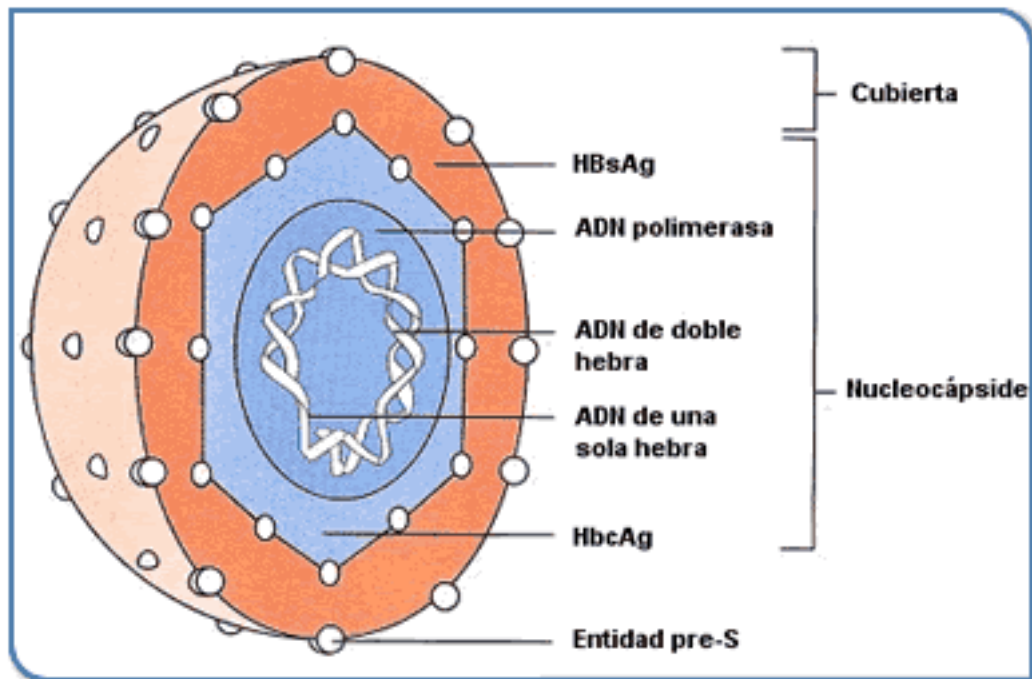
El objetivo de este experimento es introducir a los estudiantes en los principios y práctica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) como herramienta para la detección del Virus de la hepatitis B por PCR

Los estudiantes adquirirán conocimientos básicos sobre el VHB y la enfermedad que produce, la hepatitis B.

2. INTRODUCCION

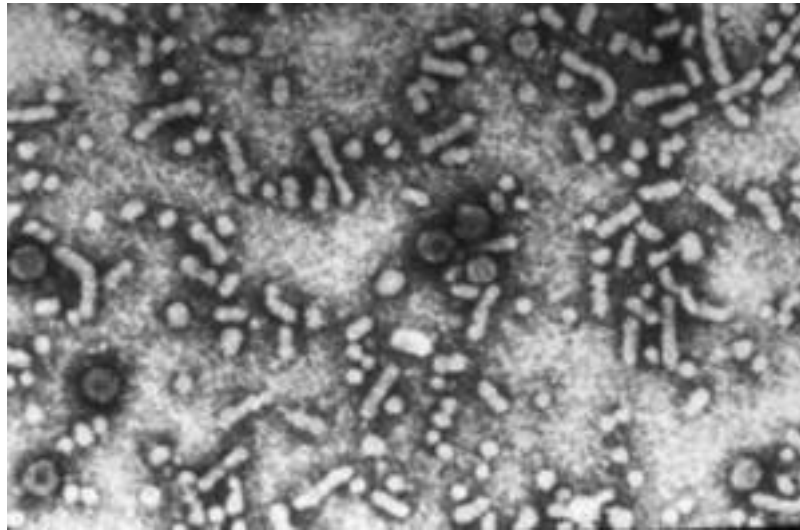
2.1 Virus de la Hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) es un hepadnavirus (hepa significa que se replica en el hígado; dna indica que su genoma consiste en DNA). El VHB se transmite a través de la sangre o fluidos del organismo; infecta principalmente el hígado produciendo una inflamación (hepatitis) que destruye los hepatocitos y puede alterar la función hepática.



Estructura del VHB

Cuando se examinan partículas del VHB intactas (también conocidas como partículas de Dane) bajo un microscopio electrónico, éstas aparecen como esferas de 42 nm de diámetro. Cada partícula del virus completa consta de un centro interno (nucleocápside) rodeado de una cubierta o envuelta proteínica externa.



Fotografía electrónica de partículas virales del virus B

La **nucleocápside** mide aproximadamente 27 nm de diámetro y contiene:

- ADN circular, parcialmente de doble hebra que contiene la información genética necesaria para la replicación viral.
- ADN polimerasa que cataliza la producción de ADN.
- Dos proteínas: HBcAg (antígeno del core).

Los principales componentes de la cubierta del virus son:

- Una proteína conocida como antígeno de superficie o HBsAg que abarca casi el 80% de la cubierta. Se han identificado ligeras variaciones en el material genético responsable de la codificación del HBsAg y que generan la producción de distintos subtipos. Estos se denominan adw, ayw, adr y ayr, donde a, d, w, y, y r se refieren a los determinantes antigénicos en la proteína de superficie HBsAg. Es importante observar que debido a que el determinante antigénico "a" es común a todos los subtipos conocidos, la exposición a un subtipo HBsAg que genere el desarrollo de anticuerpos protectores, protegerá contra todos los subtipos HBsAg.
- Otras 2 proteínas: pre-S1 y pre-S2, que conforman la entidad pre-S.

Partículas del VHB

Durante una infección por el virus de la hepatitis B, en los hepatocitos se producen grandes cantidades de antígeno de superficie. Sin embargo, sólo pequeñas cantidades del HBsAg se combinan con las nucleocápsides para formar partículas de virus completas. El resto, en su mayoría, es liberado al torrente sanguíneo como pequeñas partículas esféricas patogénomicas y filamentos; estas partículas no son infecciosas debido a que no contienen ADN. El HBsAg funciona como un importante marcador serológico de infección por el VHB.

Replicación del virus de la hepatitis B

Cuando una persona se infecta con el VHB, éste invade los hepatocitos donde se replica. Las nucleocápsides se producen en el citoplasma del hepatocito, en tanto que las partículas del VHB completas, las partículas de Dane, se producen en las membranas intracelulares. Los hepatocitos secretan entonces las partículas de Dane y se liberan a la circulación. Pueden infectar a los hepatocitos cercanos o transmitirse a un nuevo huésped a través de la sangre u otros fluidos del organismo.

2.2 La enfermedad: Hepatitis B

La hepatitis B es una enfermedad hepática causada por el virus de la hepatitis B (HBV). El virus de la hepatitis B fue el primer virus de hepatitis que se identificó. Es una enfermedad que afecta a 300 millones de personas en el mundo y se estima que es responsable de entre 250.000 y 500.000 muertes al año.

La hepatitis B es endémica en China y otras zonas de Asia. La mayoría de las infecciones se producen en esa región durante la infancia, y el 8%-10% de la población adulta está infectada de forma crónica. El cáncer hepático causado por la hepatitis B es una de las tres primeras causas de cáncer en el hombre, y también es una causa importante de cáncer en la mujer en esa región.

También hay tasas elevadas de infección crónica en la cuenca del Amazonas y en el sur de Europa oriental y central. Se calcula que un 2%-5% de la población general de Oriente Medio y del subcontinente indio padece infección crónica. En Europa occidental y Norteamérica, la población con infección crónica no llega al 1%.

La mayoría de las personas que adquieren el virus de la hepatitis B se recupera sin consecuencias. Esta forma de infección, que dura menos de 6 meses, se conoce como hepatitis B aguda. Por el contrario, cuando la infección perdura por más de 6 meses, se conoce como hepatitis B crónica. Aproximadamente el 5% de los adultos que adquieren la infección desarrollan la forma crónica. La probabilidad de desarrollar una hepatitis B crónica depende de la edad y del estado inmunitario (defensas) del sujeto, siendo mayor cuando se adquiere en la infancia que cuando se adquiere siendo adulto.

Las manifestaciones clínicas de la infección por el virus de la hepatitis B son muy variadas, y es importante recalcar que frecuentemente esta infección puede no dar ningún síntoma por muchos años lo cual no significa necesariamente que la infección esté controlada. El daño que produce el virus de la hepatitis B en el hígado es también variable y depende de la capacidad de reparación del hígado y de la capacidad del organismo de controlar la infección. Las consecuencias más importantes de esta infección en el largo plazo son el desarrollo de cirrosis hepática y de carcinoma hepatocelular.

En el último tiempo se han desarrollado una serie de nuevas alternativas de tratamiento de la enfermedad. Por otro lado, se cuenta con una vacuna altamente efectiva y segura para prevenir la infección.

Síntomas de la hepatitis B

Hepatitis B aguda

Los síntomas de la hepatitis B aguda se presentan después de 1 a 4 meses de la adquisición del virus. Muchas personas pueden no presentar ningún síntoma. Entre los síntomas se incluyen:

- Cansancio.
- Disminución del apetito (anorexia).
- Náuseas.
- Ictericia o coloración amarillenta de la piel.
- Coluria.
- Dolor en la zona superior derecha del abdomen.

- Dolor o inflamación de las articulaciones.
Estos síntomas habitualmente desaparecen en un lapso de 3 meses

Una proporción muy baja de las personas con hepatitis B aguda (0.1 a 0.5%) desarrollan una forma más grave de la enfermedad caracterizada por falla del hígado (hepatitis fulminante).

Hepatitis B crónica

La hepatitis B crónica frecuentemente es asintomática o sólo se manifiesta por síntomas inespecíficos como cansancio o disminución del apetito. Ocasionalmente se presentan exacerbaciones de la actividad inflamatoria del hígado que pueden traducirse en exacerbaciones de los síntomas. En la medida que la infección produce un daño mayor en el hígado, pueden manifestarse los síntomas de la cirrosis hepática.

Vías de transmisión de la hepatitis B

El virus de la hepatitis B se transmite a través del contacto con sangre o fluidos corporales contaminados. Las vías de transmisión incluyen:

- **Relaciones sexuales:** Probablemente la forma más frecuente de contagio en Chile. La transmisión puede ser través de relaciones tanto hetero como homosexuales.
- **Transfusiones de sangre:** Actualmente es una forma de transmisión prácticamente inexistente debido a los exámenes practicados rutinariamente a la sangre que es empleada para transfusiones.
- **Transmisión perinatal:** Consiste en la transmisión del virus de la hepatitis B de la madre al hijo, habitualmente cercano al momento del parto. Es una importante vía de contagio en países de alta prevalencia como China.
- **Drogas inyectables:** El uso de jeringas y/o agujas contaminadas es una importante vía de contagio.
- **Tatuajes,** perforaciones o "piercing" realizadas con material no desechable.
- **Contacto cercano:** La infección puede producirse si sangre de una persona infectada entra en contacto con las membranas mucosas (ojos, boca, genitales) o con pequeñas heridas de otra persona. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se comparte una hoja de afeitar, un cepillo de dientes o un cortaúñas.
- **Procedimientos médicos:** El virus de la hepatitis B puede transmitirse por instrumentos contaminados durante procedimientos médicos invasivos como cirugías si no se aplican las precauciones necesarias.

Diagnóstico de la hepatitis B

La infección por el virus de la hepatitis B habitualmente se diagnostica en una persona que tiene los síntomas de una hepatitis aguda, o a través de la investigación de alteraciones de las pruebas hepáticas en un paciente sin síntomas. En cualquier caso, el médico interrogará al paciente acerca de factores de riesgo para adquirir el virus y buscará en el examen físico los signos que puedan orientar hacia la presencia de cirrosis hepática.

Debido a que muchas enfermedades hepáticas pueden tener manifestaciones clínicas similares a la hepatitis B, habitualmente los exámenes de laboratorio son los que dan el diagnóstico definitivo.

- **Aminotransferasas:** También conocidas como transaminasas, son exámenes que permiten estimar el grado de inflamación hepática. La ALT (alanino-transferasa o SGPT) y la AST (aspartato-transferasa o SGOT) pueden elevarse a valores sobre 1000 U/L en una hepatitis aguda y varían desde el rango normal (menos de 40 U/L) hasta algunos cientos en la hepatitis crónica.
- **Bilirrubina:** La bilirrubina es un producto de degradación de la hemoglobina de los glóbulos rojos que es eliminada por el hígado. Su elevación indica una falla más importante de la capacidad excretora hepática y se manifiesta como ictericia.
- **Albúmina:** La albúmina es la principal proteína del plasma y es producida en el hígado. Su disminución habitualmente indica un daño importante del hígado.

- **Tiempo de protrombina:** La protrombina es una proteína producida por el hígado que sirve para la coagulación. Su medición se expresa como porcentaje del valor normal o como INR (international normalized ratio). El INR normal es 1. A medida que disminuye la producción de protrombina el INR aumenta.
- **Marcadores virales:** El virus de la hepatitis B puede detectarse a través de una serie de exámenes que detectan directamente proteínas producidas por el virus (antígenos) o la respuesta inmunológica producida por el organismo contra el virus (anticuerpos). El antígeno de superficie de hepatitis B (*HBsAg*) está presente tanto en la infección aguda como crónica. Su permanencia por más de 6 meses define a la hepatitis B crónica. Los anticuerpos anti-core pueden ser de tipo IgG o IgM (*IgM anti-HBc*). La presencia de IgM anti-HBc generalmente indica una infección aguda. La detección del antígeno e (*HBeAg*) es un indicador de infección activa y de replicación viral. Su detección es importante durante el tratamiento, ya que su desaparición indica que la replicación viral ha sido controlada. En algunos pacientes puede haber variantes del virus que sufren una mutación (mutantes pre-core) y no producen HBeAg, a pesar de existir infección activa.
- **Carga viral:** La detección y cuantificación del DNA (material genético) viral es una excelente forma de monitorizar el grado de replicación viral. Se usa frecuentemente para diagnosticar y monitorizar la respuesta a terapia.
- **Biopsia hepática:** La obtención de un trocito de hígado para análisis microscópico es una excelente manera de determinar el grado de daño existente en el hígado, importante para decidir la terapia. Ver información sobre la biopsia hepática.

Tratamiento de la hepatitis B

La hepatitis B aguda no requiere tratamiento específico, ya que el 95% de los adultos se recuperan espontáneamente. Es importante recordar que los contactos de la persona con hepatitis B aguda deben ser evaluados y eventualmente vacunados. La hepatitis B aguda es altamente contagiosa, por lo que deben tomarse las medidas para evitar su transmisión.

Las personas que desarrollan hepatitis B crónica deben ser evaluadas por un médico con experiencia en el manejo de esta enfermedad (gastroenterólogo o hepatólogo). Las decisiones de tratamiento son individualizadas. El objetivo del tratamiento es mantener controlada la replicación del virus para evitar el daño progresivo del hígado.

Medidas generales: Los pacientes con hepatitis B crónica deben recibir la vacuna contra la hepatitis A si no son inmunes. Se recomienda evitar el consumo de alcohol y de medicamentos que no sean claramente necesarios. El sobrepeso y la obesidad pueden ser factores que contribuyan a dañar el hígado (ver dieta) causando hígado graso. En los pacientes con cirrosis habitualmente se recomienda una ecografía abdominal y medir niveles de alfafetoproteína cada 6 meses.

Tratamiento antiviral: Existen al menos 3 opciones de tratamiento para la hepatitis B crónica de primera línea, los que incluyendo el interferón y los antivirales orales entecavir y tenofovir. La decisión sobre el momento de iniciar el tratamiento y sobre qué tipo de medicamento usar debe considerar todos los antecedentes clínicos y de laboratorio del paciente y habitualmente es una decisión compartida entre el médico y el paciente. Es muy importante considerar que el virus de la hepatitis B puede mutar desarrollando cambios en la estructura de la enzima polimerasa que hacen que los antivirales orales no sean efectivos (resistencia). Para evitar la resistencia es indispensable que el paciente tenga una excelente adherencia al tratamiento.

- **Interferón:** El interferón alfa es una sustancia normalmente producida por las células inmunes del organismo frente a infecciones, particularmente virales. Este medicamento se usa en inyecciones subcutáneas (bajo la piel). Actualmente se prefiere una formulación llamada interferón pegilado o peginterferón que permite su administración una vez por semana. La duración del tratamiento es de entre 4 y 12 meses. Es un tratamiento que puede tener bastantes efectos adversos, pero tiene la ventaja de que cuando se logra una respuesta, ésta habitualmente es sostenida en

- el tiempo. No se debe usar cuando el paciente tiene una cirrosis descompensada.
- **Entecavir:** El entecavir es un potente medicamento antiviral -análogo de nucleósido- cuyas principales ventajas son su potente actividad antiviral y bajo desarrollo de resistencia. Es bien tolerado. Debido a que se ha demostrado que tiene actividad contra el virus HIV, no debe usarse en personas co-infectadas con HIV si no están con terapia antiretroviral (ver co-infección hepatitis B-HIV).
 - **Tenofovir:** Es un análogo de nucleótido que se desarrolló inicialmente como un tratamiento contra el virus HIV. Al igual que el entecavir, es una droga de alta potencia y bajo potencial de desarrollo de resistencia. Es muy bien tolerado.
 - **Otros antivirales:** La **lamivudina** es un medicamento que se administra oralmente en dosis de 100 mg al día. Este compuesto inhibe directamente al virus interfiriendo con los mecanismos de replicación viral. Es un medicamento muy bien tolerado, casi sin efectos adversos. El inconveniente mayor de este tratamiento es que requiere ser usado por períodos largos de tiempo y puede causar la aparición de virus resistentes (mutación de la región YMDD de la polimerasa), que se asocian a falta de respuesta al tratamiento. El **adefovir** funciona de manera similar a la lamivudina, inhibiendo la polimerasa viral. Es bien tolerado en general, sin embargo tiene el potencial de dañar la función renal, por lo que ésta vigilarse con exámenes periódicos. Su ventaja sobre la lamivudina es que la posibilidad de generar mutantes resistentes es mucho menor. La **emtricitabina** y la **telbivudina** son antivirales orales que pueden también ser utilizados, pero no se consideran como medicamentos de primera línea cuando se utilizan como monoterapia.
 - **Trasplante hepático:** Es una opción de tratamiento para algunos pacientes cuando se ha establecido una cirrosis descompensada. El trasplante hepático para personas con hepatitis B es más complejo que para otras indicaciones, ya que requiere tratamientos de alto costo para controlar la replicación del virus luego del trasplante.

Prevención de la hepatitis B

La vacuna contra la hepatitis B es el principal pilar de la prevención de esa enfermedad. La OMS recomienda que se administre a todos los lactantes.

La vacuna se puede integrar en el calendario vacunal y se administra en tres o cuatro dosis. En las zonas donde es frecuente la transmisión del VHB de la madre al niño, la primera dosis debe administrarse lo antes posible tras el nacimiento (en las primeras 24 horas).

La vacunación completa induce anticuerpos que alcanzan concentraciones protectoras en más del 95% de los lactantes, niños y adultos jóvenes. La protección dura al menos 20 años y posiblemente persiste toda la vida.

Se debe vacunar a todos los niños y adolescentes de menos de 18 años que no hayan sido vacunados con anterioridad. Se debe vacunar también a las poblaciones de alto riesgo, en particular a:

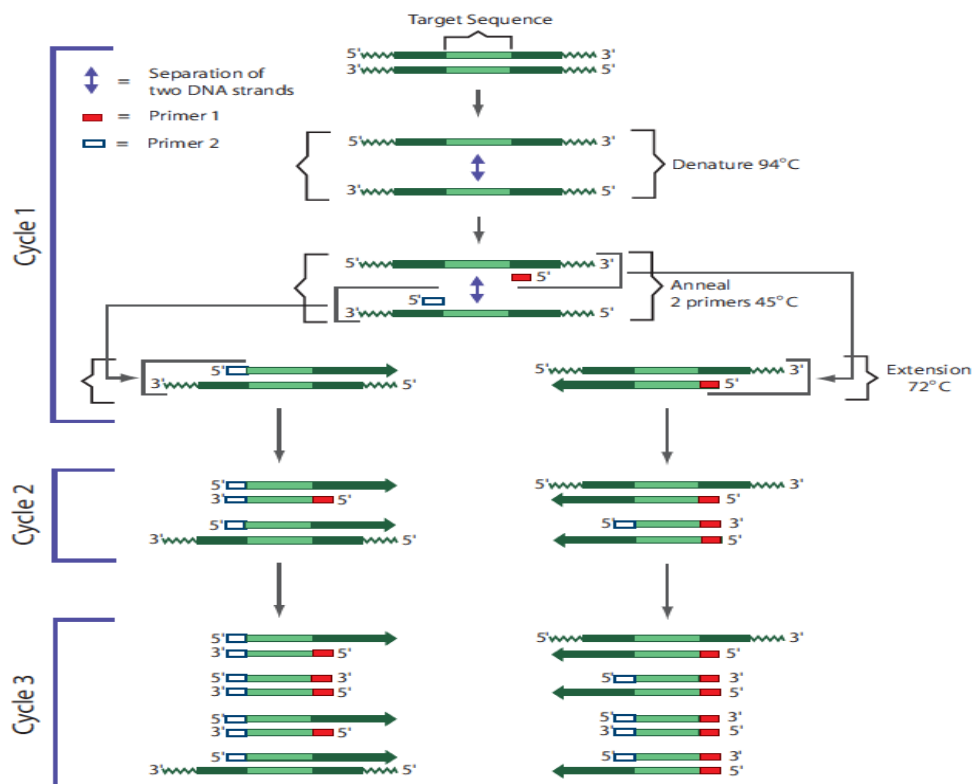
- personas con comportamientos sexuales de alto riesgo;
- parejas y contactos domésticos de personas infectadas;
- consumidores de drogas inyectables;
- pacientes que necesitan transfusiones frecuentes de sangre o productos sanguíneos;
- receptores de trasplantes de órganos sólidos;
- individuos con riesgo laboral de infección por VHB, como los profesionales sanitarios, y
- viajeros internacionales a países con altas tasas de infección por VHB.

2.3 La PCR

La PCR ha tenido un extraordinario impacto en varios aspectos de la Biotecnología.

En una reacción de PCR, el primer paso es la preparación de la muestra de ADN que es extraída de varias fuentes biológicas o tejidos. En la PCR, el ADN o gen a amplificar se define como "target" (diana) y los oligonucleótidos sintéticos utilizados se definen como "primers" (cebadores). Un set consta de 2 cebadores de entre 20-45 nucleótidos que son sintetizados químicamente para que se correspondan con los extremos del gen a amplificar. Cada cebador se une a uno de los extremos de cada cadena de ADN y es el punto de inicio de la amplificación.

Una reacción típica de PCR contiene ADN molde, Taq polimerasa y los 4 dNTPS en un tampón de reacción apropiado. El volumen total de reacción es de 25-50 μ l. En el primer paso de la reacción de PCR, las cadenas complementarias de ADN se separan (desnaturalizadas) la una de la otra a 94°C, mientras que la Taq polimerasa permanece estable. En el segundo paso, conocido como emparejamiento, la muestra es enfriada a una temperatura entre 40-65°C que permita la hibridación de los 2 cebadores, cada uno a una hebra del ADN molde. En el tercer paso, conocido como extensión, la temperatura es elevada a 72°C y la Taq polimerasa añade nucleótidos a los cebadores para completar la síntesis de una nueva cadena complementaria.



Estos tres pasos, desnaturalización-emparejamiento-extensión, constituye un ciclo de PCR. Este proceso se repite durante 20-40 ciclos amplificando la secuencia objeto exponencialmente. La PCR se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que es programado para un rápido calentamiento, enfriamiento y mantenimiento de las muestras durante varias veces. El producto amplificado es luego detectado por separación de la mezcla de reacción mediante electroforesis en gel de agarosa.

En esta práctica se realizará una PCR simulada ya que el instrumento para llevar a cabo la PCR tiene un coste muy elevado, para ello se utilizarán colorantes NO TOXICOS que migrarán en el gel de agarosa como si se tratasen de los fragmentos de ADN amplificados.

3. EXPOSICIÓN DE LOS HECHOS

María Lasosa trabaja en el Banco de Sangre y Tejidos de Barcelona como técnico de calidad, su misión consiste en realizar los diferentes análisis para asegurar que las donaciones de sangre que se realizan son seguras y aptas para transfusiones.

Hoy va a recontrolar 4 muestras que salieron mal en el primer control, estas muestras dieron positivo para el virus de la hepatitis B, por tanto, es necesario realizar un control por PCR para asegurar la calidad de la sangre y por otro lado por si dan positivo para el VHB informar a los donantes.

Utiliza un kit comercial de la casa NORGEN BIOTEK, este kit permite realizar la extracción del ADN a partir del suero y a su vez realizar la PCR para la detección del VHB.

Este kit permite amplificar un **fragmento de 750 pb del VHB**, además la reacción de la PCR genera un fragmento de 300 pb, esta amplificación es muy importante que esté presente en todas las muestras ya que se utiliza como control de amplificación, es decir, es un control de que la reacción de la PCR funciona.

4. COMPONENTES

Tampón de electroforesis concentrado 10 X (2 envases 500ml)	2 x 50 ml
Agarosa	1.75 gr
Micropipeta 20 microlitros	1
Rack de puntas	1
Microtubos de muestras	6

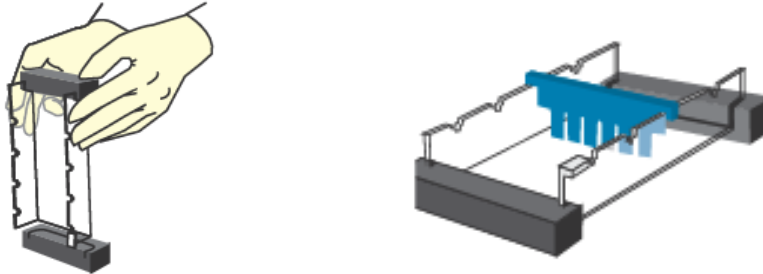
Añadir 450 ml de agua destilada a cada envase de Tampón de electroforesis 10 X para elaborar 2 x 500 ml de Tampón de electroforesis 1 X que es el Tampón de trabajo.

5. PRACTICA

5.1 PREPARACION GEL DE AGAROSA

A) Preparación del molde

Coger el molde para hacer los geles y cerrar los extremos con los topes para que no se salga la agarosa. Después colocar el peine para formar los pocillos.



B) Preparación del gel de agarosa

1.b) Utilizar un vaso o erlenmeyer de 100 ml para preparar la solución del gel:

2.b) **Para geles de 7 x 7 cm:** Añadir **32 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.30 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa.

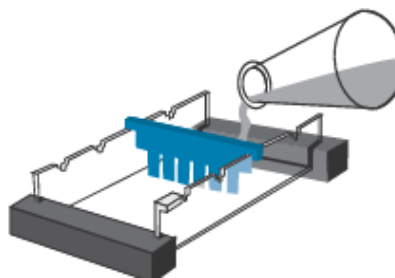
Para geles de 7 x 10 cm: Añadir **42 ml de Tampón de electroforesis 1 X** más **0.40 gr de agarosa**, agitar la mezcla para disolver los grumos de agarosa

Asegurarse que se ha añadido los 450 ml de agua destilada al Tampón de electroforesis 10 X

3.b) Calentar la mezcla para disolver la agarosa, el método más rápido es la utilización de un microondas, también puede utilizarse un placa calefactora, en ambos casos, para que la agarosa se disuelva se ha de llevar **la solución a punto de ebullición**. La solución final debe aparecer clara sin partículas aparentes.

4.b) **Enfriar** la solución de agarosa más o menos a 55°C (para acelerar el proceso se puede enfriar colocando el envase debajo de un grifo de agua y agitar). Si se produce mucha evaporación del líquido, añadir tampón de electroforesis.

5.b) Añadir la solución de agarosa al molde.

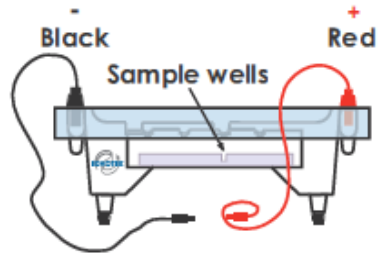


6.b) Permitir que el gel solidifique. Para acelerar el proceso se puede sembrar el gel en una nevera (si la electroforesis se realizará al día siguiente, conservar el gel a 4°C).

C) Preparación del gel para la electroforesis

1.c) Después que el gel se ha solidificado con mucho cuidado sacar los topes.

2.c) Colocar el gel en la cámara de electroforesis correctamente orientada con los pocillos más cerca del polo negativo (color negro).



3.c) Llenar la cámara de electroforesis con **300 ml de Tampón de electroforesis**. **El tampón de electroforesis se puede utilizar para 2 experimentos de electroforesis, una vez terminada la electroforesis guardar este tampón utilizado en un envase diferente al suministrado para utilizarlo en una nueva electroforesis.**

4.c) Asegurarse que el gel está completamente cubierto de tampón.

5.c) Sacar el peine que ha formado los pocillos con mucho cuidado de no romper ningún pocillo.

6.c) Proceder a la siembra del gel y llevar a cabo la electroforesis.

5.2 SIEMBRA DEL GEL Y ELECTROFORESIS

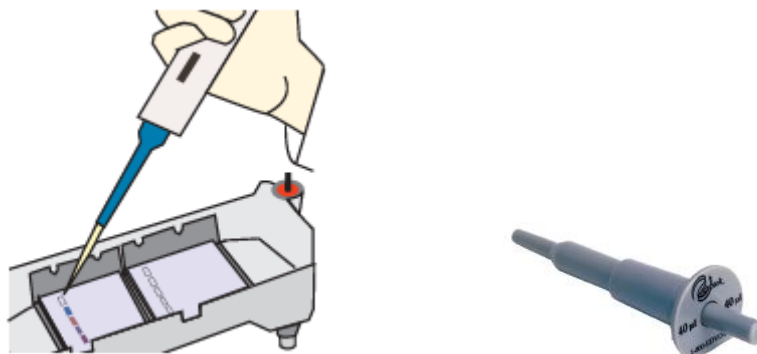
Nota: Si usted no está familiarizado con la siembra de geles de agarosa, es recomendable que practique la siembra antes de llevar a cabo el experimento, o llevar a cabo el experimento completo antes de realizarlo con los alumnos.

A) **Muestras de electroforesis:** *Chequear el volumen de las muestras. Algunas veces pequeñas gotas de la muestra puede estar en las paredes de los microtubos. Asegurarse de que toda la cantidad de muestra se encuentra uniforme antes de sembrar el gel. Centrifugar brevemente los microtubos de muestra, o golpear los microtubos contra una mesa para obtener toda la muestra en la parte inferior del microtubo.*

1.a) Se suministran 6 muestras diferentes presentadas en 6 tubitos cada uno de un color, sembrar o cargar las muestras en el siguiente orden:

Pocillo	Muestra	Descripción
1	Verde	MARCADOR
2	Rojo	CONTROL POSITIVO
3	Lila	DONANTE 1
4	Azul	DONANTE 2
5	Amarillo	DONANTE 3
6	Blanco	DONANTE 4

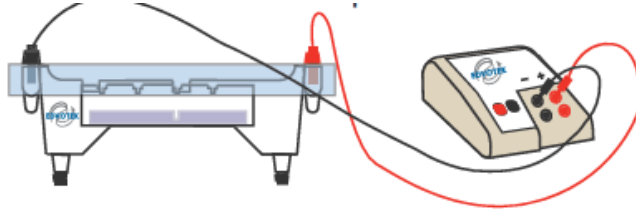
2.b) Sembrar 20 microlitros de cada muestra, utilizar para ello la micropipeta de volumen fijo que se suministra con una punta de pipeta.



B) Llevar a cabo la electroforesis

1.b) Después que se han sembrado las muestras, cuidadosamente colocar la cubierta del aparato de electroforesis en los terminales de los electrodos.

2.b) Insertar la clavija del cable negro en la entrada de color negro de la fuente de corriente (entrada negativa). Insertar la clavija del cable rojo en la entrada de color rojo de la fuente de corriente (entrada positiva).



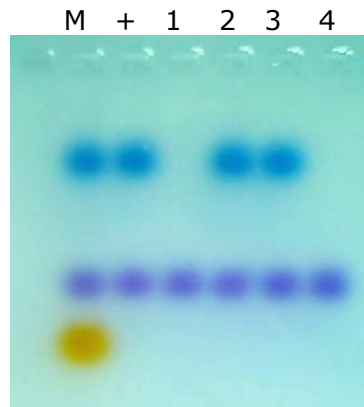
3.b) Configurar la fuente de corriente a **75 voltios (30 minutos) o a 150 voltios (20 minutos)** . **Vigilar que los colorantes no salen fuera del gel.**

4.b) Después de 10 minutos empezará a observarse la separación de los colorantes.

5.b) Después de que la electroforesis ha terminado, **apagar la fuente de corriente**, desconectar los cables y sacar la cubierta.

6.b) Colocar el gel en un transiluminador de luz blanca (si no se dispone, una hoja de papel blanco también puede utilizarse).

6. RESULTADOS



M: El marcador de peso molecular tiene 3 fragmentos (750 pb que se corresponde con el fragmento del VHB, 300 pb que se corresponde con el control de PCR, 200 pares de base).

+: Control positivo, sirve para controlar que la reacción de PCR funciona.

1, 2, 3 y 4: 4 diferentes donantes de sangre.

7. PREGUNTAS Y RESPUESTAS SOBRE LA PRÁCTICA

Una serie de preguntas se pueden realizar a los alumnos sobre la práctica:

- 1. ¿Cuál es la diferencia entre la reacción de PCR y la replicación en células?**
En la replicación (síntesis de ADN en células) intervienen gran cantidad de proteínas en todos los pasos de síntesis y división celular y las reacciones se llevan a cabo a 37°C (temperatura corporal). En la PCR, sólo se realiza la síntesis y se realiza a temperaturas no fisiológicas.
- 2. ¿Cuál es la función de los 4 nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) en una reacción de PCR?** Los 4 dNTPs son los componentes del ADN. Para la síntesis de ADN se requiere un ADN molde y 2 cebadores, la cadena opuesta del molde es sintetizada siguiendo la regla de emparejamiento de bases de Watson-Crick.
- 3. ¿Por qué hay 2 diferentes cebadores o "primers"?** Presentan una secuencia diferente que coincide con el inicio y final del gen o secuencia a amplificar (ADN molde).
- 4. ¿Qué donantes han dado positivo para el VHB?** Donante 2 y 3.
- 5. ¿Es apta la sangre de estos donantes para realizar transfusiones?** No.
- 6. ¿El VBH, es un virus de ADN o ARN?** ADN.
- 7. ¿Para qué sirve el control+ de la PCR?** En todas las PCR es necesario incluir un control +, a esa reacción se añaden fragmentos de ADN del VHB y nos informa de cómo debe salir un resultado positivo.
- 8. ¿Qué nos indica la presencia de una banda de 300 pb en todas las reacciones?** Nos indica que en todos los casos la reacción de la PCR ha funcionado, esto es muy importante en aquellos caso que no se observa la banda de 700 pb, de esta forma se descartan falsos negativos, la banda del VHB no se ha amplificado pero si la de control de la PCR.

Para cualquier duda o consulta adicional, por favor, contacte con nosotros biotod@arrakis.es