

Determinación del alelo HLA-B27 mediante la PCR en tiempo real

Rangel-Velázquez S, Ortega-Carballosa A, González-García N, Martínez-Echevarría MT, García-Menéndez G.

Hospital Clínico Quirúrgico “Hermanos Ameijeiras”, La Habana, Cuba

Email: suchiquil@infomed.sld.cu

RESUMEN

El alelo HLA B-27 es un factor asociado a la susceptibilidad genética de padecer espondiloartritis (SpA), enfermedad inflamatoria crónica donde interviene el sistema inmune. La técnica de PCR, con el empleo de sondas específicas (PCR-SSP), ha sido empleada para la determinación de este alelo, sin embargo, requiere para su realización una concentración de ADN entre 50-100 ng, lo cual constituye, entre otras, una desventaja del método. El objetivo del presente trabajo es la implementación de una nueva tecnología que, basada en los mismos principios del PCR-SSP, remedia los inconvenientes del método anterior, pues detecta dicho polimorfismo en un límite de 2 ng en menor tiempo. El PCR en Tiempo real (PCR-TR) se realizó empleando un estuche comercial LightMix HLA-B27, SimpleProbe TIBMOBOL (ROCHE) y se procesó en un equipo de PCR-RT Lightcycler 96 (ROCHE). Se empleó un panel de 5 muestras controles determinadas mediante el método de alta resolución OLERUP SSP® y se analizaron 50 muestras de ADN de pacientes con sospecha clínica SpA. Los resultados obtenidos mostraron concordancia entre ambos métodos lo que muestra la sensibilidad y especificidad de la nueva técnica. El PCR-TR es una prueba más sensible, específica y rápida para la detección del alelo HLA B-27 y permite un diagnóstico más eficiente en menor tiempo, lo cual repercute en beneficio del paciente.

Palabras clave: HLA-B27, PCR-TR, espondiloartritis.

INTRODUCCIÓN

El alelo HLA-B*27 es un factor asociado a la susceptibilidad genética de padecer espondiloartritis (SpA), enfermedad inflamatoria crónica donde interviene el sistema inmune.^{1, 2}

La técnica de PCR, con el empleo de sondas específicas (PCR-SSP), ha sido empleada para la determinación de este alelo, sin embargo, requiere para su realización una concentración de ADN entre 50-100 ng, lo cual constituye, entre otras, una desventaja del método. El objetivo del presente trabajo es la implementación de una nueva tecnología que, basada en los mismos principios del PCR-SSP, remedia los inconvenientes del método anterior, pues detecta dicho polimorfismo en un límite de 2 ng en menor tiempo.^{3,4}

OBJETIVOS

General: Implementación del PCR-TR para la detección del alelo HLA-B*27.

Específico: Demostrar la concordancia entre los métodos de PCR-TR y Olerup SSP de alta resolución para la detección del alelo HLA-B*27.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestra: El material genético se obtuvo a partir de sangre total con EDTA como anticoagulante, empleando el estuche comercial High Pure Template Preparation Kit (ROCHE) según las normas del fabricante. El ADN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop TM One. Para la implementación del método PCR-TR se analizaron 5 muestras de ADN positivas para el alelo HLA-B*27 las cuales fueron determinadas por el método de alta resolución OLERUP SSP®. Fueron analizadas un total de 50 muestras de ADN genómico de individuos con diagnósticos presuntivos de SpA. Como control negativo del ensayo se empleó el agua y controles negativos brindados por el estuche.

PCR-TR: La determinación del alelo HLA-B*27 se realizó en un equipo de PCR en Tiempo Real, LightCycler 96 (Roche diagnostic LightCycler system), empleando el estuche comercial LightMix HLA-B*27, SimpleProbe TIBMOBBIOL, el cual emplea sondas específicas de hibridación. Como control interno utiliza un fragmento del gen de la beta-globina el cual muestra un pico de temperatura de disociación ($T_m=56^{\circ}\text{C}$). Se analizaron las temperaturas de disociación siendo considerados positivas aquellas muestras en que se observaban dos picos, uno correspondiente al gen constitutivo de la beta-globina y otro los 64°C (según las normas del fabricante) correspondiente a la presencia del alelo HLA-B*27. Se diagnosticaron como negativas aquellas en las que solo amplificaron el gen de control interno.

Análisis estadístico: Los datos se analizaron empleando el programa SPSS para Windows, versión 20.0. Se realizó un análisis de concordancia, empleando el índice Kappa.

RESULTADOS

Las muestras de ADN procesadas mediante la técnica de PCR-TR para la determinación del alelo HLA-B*27, mostraron concentraciones mayores de 2ng/ml y una pureza entre 1.8 y 2.0 lo cual permitió la realización del ensayo con calidad y seguridad de los resultados.

Las muestras que previamente fueron determinadas como positivas para el HLA-B*27 por el método de alta resolución OLERUP SSP[®] resultaron positivas también por el método de PCR-TR. La concordancia entre ambos métodos fue del 100% lo que demuestra la eficiencia del mismo (Tabla)

De las 50 muestras analizadas por el PCR-TR, el 16 % (n=8) resultaron positivas para el alelo HLA-B*27 y el 84 % (n=42) resultaron negativas.

Tabla. Resultados de las muestras estudiadas por ambos métodos

Muestras	Resultados Olerup	Resultados PCR-RT		
		TM1(°C)	TM2(°C)	Resultado
1	Positivo	53,96	62,53	Positivo
2	Positivo	53,96	62,53	Positivo
3	Positivo	53,98	62,52	Positivo
4	Positivo	54,00	62,51	Positivo
5	Positivo	54,02	62,51	Positivo

TM1: temperatura melting del control interno (valor de referencia $54 \pm 2,5^\circ\text{C}$).

TM2: temperatura melting del alelo HLA-B*27 (valor de referencia $62,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron concordancia entre ambos métodos lo que muestra la eficiencia de la nueva técnica. El PCR-TR es una prueba más sensible, específica y rápida para la detección del alelo HLA-B*27 y permite un diagnóstico más eficiente en menor tiempo, lo cual repercute en beneficio del paciente.

RECOMENDACIONES

Recomendamos el empleo del PCR-TR en la plataforma roche para la detección del alelo HLA-B*27 y su empleo como herramienta diagnóstica

BIBLIOGRAFÍA

1. Chavan H SR, Deshpande A, Mankeshwar R. Correlation of HLA B27 subtypes with clinical features of ankylosing spondylitis. International journal of rheumatic diseases. 2011;14(4):369-74.

2. Yang T DZ, Wu S, Liu S, Zeng Z, Li G, et al. Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis. *Modern rheumatology*. 2014;24(1):150-61.
3. Tiemann C, Vogel A, Dufaux B, Zimmer M, Krone JR, Hagedorn HJ. Rapid DNA typing of HLA-B27 allele by real-time PCR using lightcycler technology. *Clinical laboratory*. 2001;47(3-4):131-4.
4. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en discapacidad*. 2013;2(2):70-8.