

Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales

José Manuel Echevarría y Ana Avellón

Unidad de Hepatitis Víricas. Servicio de Microbiología Diagnóstica. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

Las hepatitis virales se diagnostican satisfactoriamente en el laboratorio mediante inmunoanálisis, para detectar antígenos y anticuerpos en suero. Sin embargo, la detección temprana de infecciones agudas durante el período de ventana, la investigación de las llamadas infecciones "ocultas", y la necesidad de cuantificar la viremia y de caracterizar en detalle las cepas de virus, como apoyo al tratamiento antiviral, han planteado nuevas necesidades que sólo las técnicas moleculares pueden satisfacer. Además, en tiempos en los que las estrategias preventivas buscan reducir significativamente la incidencia de estas infecciones, o incluso llegar a la erradicación de algunas de ellas, la caracterización completa de los brotes epidémicos y de los casos que puedan indicar la emergencia de variantes virales de escape a vacuna son objetivos importantes para la salud pública, y sólo pueden alcanzarse con la asistencia de estas técnicas. La incorporación de estos métodos a la rutina de los centros de transfusión, en un esfuerzo más para mejorar la seguridad de la transfusión sanguínea, ha generado nuevas necesidades de apoyo por parte del laboratorio de microbiología, que obligan a éste a incorporarlas también a su trabajo diario. Después de más de una década, las circunstancias han permitido que los métodos automatizados para detectar, cuantificar, caracterizar y secuenciar los genomas de estos virus sean una realidad al alcance del microbiólogo asistencial, lo que no hace sino abundar en la necesidad de que los laboratorios hospitalarios sigan contando con especialistas capacitados para su correcto manejo.

Palabras clave: Hepatitis virales. Diagnóstico molecular. Hepatitis A. Hepatitis B. Hepatitis C. Hepatitis E.

Utility of molecular biology in the microbiological diagnosis of viral hepatitis

Viral hepatitis are satisfactorily diagnosed in the laboratory by immunoassays for either antigen or antibody

detection in serum samples. However, the early detection of acute infections during the window period, investigation of "occult" infections, and issues related to the establishment and follow-up of antiviral therapy in chronic infections pose new challenges that only molecular methods can meet. In addition, full characterization of epidemic outbreaks and surveillance of the emergence of viral variants able to escape from vaccine protection are major public health objectives that can only be achieved through the use of these techniques. As a further attempt to improve the viral safety of blood transfusions, the incorporation of molecular biology techniques into the routine work of transfusion centers has generated new technical and scientific demands on microbiology laboratories, which must in turn incorporate these methods to respond to the challenge. After more than a decade, automatic methods for the detection, quantification, characterization and sequencing of the genomes of these viruses have become a reality for the clinical laboratory, reaffirming the essential role of the microbiologist in the hospital setting.

Key words: Viral hepatitis. Molecular diagnosis. Hepatitis A. Hepatitis B. Hepatitis C. Hepatitis E.

Introducción

El diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales se ha basado tradicionalmente en el uso de métodos serológicos para detectar antígenos y anticuerpos específicos, y esa estrategia continúa siendo, en gran medida, la actual¹. No obstante, la utilización de técnicas de diagnóstico molecular con fines de investigación clínica ha puesto de manifiesto algunas limitaciones en esta estrategia, y ha abierto un espacio para esas técnicas en las labores de diagnóstico. Además, a medida que se ha constatado la importancia de la cuantificación de la viremia en el seguimiento del tratamiento antiviral, y se han ido estableciendo correlaciones de interés entre algunas peculiaridades de las cepas virales (genotipo, variantes genéticas y antigénicas) y algunas cuestiones relacionadas con el pronóstico o el tratamiento del paciente y su entorno (escape a inmunidad protectora, reactivación de la infección, resistencia al tratamiento), el diagnóstico microbiológico se ha ampliado, conceptualmente, más allá de la mera identificación del agente etiológico, incluidos objetivos

Correspondencia: Dr. J.M. Echevarría.
Servicio de Microbiología Diagnóstica. Centro Nacional de Microbiología.
Instituto de Salud Carlos III. 28220 Majadahonda. Madrid. España.
Correo electrónico: jmecheva@isciii.es

que sólo las técnicas de caracterización molecular pueden cubrir.

Otro aspecto que favorece la incorporación de las técnicas moleculares en los laboratorios que realizan el diagnóstico de las hepatitis virales es la introducción de algunas de ellas en la práctica habitual del banco de sangre, toda vez que genera nuevas necesidades de apoyo por parte del microbiólogo. Tras la incorporación por norma de la detección del ácido ribonucleico (ARN) del virus de la hepatitis C (VHC), para detectar las unidades de sangre donadas durante el período de ventana de la infección aguda, todo parece indicar que la del ácido desoxirribonucleico (ADN) del virus de la hepatitis B (VHB) no tardará mucho en ser obligatoria. La detección de donaciones positivas para el ADN viral y negativas para el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), tanto las realizadas durante el período de ventana de la infección aguda, como las procedentes de donantes sospechosos de presentar la infección "oculta", podrían justificar esa decisión².

Desde un punto de vista práctico, las técnicas serológicas y las de diagnóstico molecular tienen poco en común, lo que ha llevado con cierta frecuencia a que se manejen en laboratorios diferentes que emiten informes independientes sobre las muestras de un mismo paciente. En esta situación, muchas veces dictada por las necesidades propias de la gestión de los recursos, hay que enfatizar que los resultados que ofrecen estas 2 aproximaciones en el ámbito de las hepatitis virales son siempre complementarios, y han de presentarse como un todo homogéneo y coherente. A nuestro juicio, esto aconseja que todos ellos se recojan siempre en un informe único y con la responsabilidad única del personal de microbiología, lo que ofrece al solicitante una interpretación global de los resultados.

Las características básicas de los agentes etiológicos de las hepatitis virales se han expuesto en una revisión reciente³, a la que remitimos al lector que desee repasarlas antes de entrar en la materia de la presente. Por lo demás, las técnicas mencionadas a continuación se encuadran en alguno de los grupos siguientes: detección cualitativa del genoma, cuantificación del genoma, amplificación-hibridación y secuenciación. La amplificación genómica cualitativa y cuantitativa se realiza mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en alguna de sus variantes. Las técnicas de amplificación más sensibles de entre las disponibles comercialmente en la actualidad son las de amplificación mediada por transcripción (TMA) y las de PCR en tiempo real. Las técnicas de PCR anidada son también muy sensibles, pero, al incluir 2 reacciones, deben manejarse en unas condiciones que eviten la contaminación cruzada de las muestras. La sensibilidad analítica de las técnicas debe tomarse como un valor aproximado, y deben tenerse en cuenta factores adicionales, como la variabilidad técnica del ensayo y la variabilidad biológica de los parámetros y factores que afectan a la muestra, como son sus condiciones de almacenamiento y transporte y los ciclos de congelación-descongelación a los que haya podido someterse. Estos últimos factores cobran especial importancia en los virus ARN, ya que éste es más fácilmente degradable por las condiciones ambientales que el ADN. En todas las amplificaciones genómicas de virus ARN por PCR debe realizarse previamente una transcriptasa inversa (RT).

Cuando el producto amplificado contiene regiones con posiciones nucleotídicas de interés, se pueden utilizar sistemas de hibridación con sondas específicas que localizan mutaciones en esas posiciones, o que identifican polimorfismos relacionados con el genotipo o con otras cuestiones relevantes (técnicas de hibridación reversa o LiPA). Además, con el fin de caracterizar completamente el fragmento amplificado, puede obtenerse su secuencia completa mediante reamplificación con nucleótidos o cebadores marcados con fluorocromos y posterior electroforesis de todos los fragmentos. El estudio mediante secuenciación reflejará la secuencia genética mayoritaria dentro de la población viral, mientras que las técnicas de LiPA podrían identificar mutaciones en población viral minoritaria.

Hepatitis virales de transmisión entérica

Hepatitis A

El diagnóstico de la hepatitis aguda por el virus de la hepatitis A (VHA) queda perfectamente cubierto por los métodos de detección de inmunoglobulina (Ig) M específica y no requiere el uso de técnicas moleculares. No obstante, hay 3 situaciones en las que esas técnicas tienen utilidad diagnóstica. La primera es la persistencia prolongada de la IgM específica en pacientes que desarrollen hepatitis autoinmunitaria tras una hepatitis A aguda⁴, en la que la detección del ARN viral en suero diferenciaría esa situación de la que deriva de una posible prolongación inusual de la infección^{5,6}. La segunda es la hepatitis aguda por reinfección del injerto, que puede suceder en pacientes sometidos a trasplante hepático tras una hepatitis A fulminante⁷. La última es el diagnóstico temprano de la infección aguda durante el período de ventana serológica, que puede ser útil en casos puntuales y en la investigación de brotes epidémicos. La amplificación de secuencias de la región 5'-no codificante del virus mediante RT-PCR en suero es el método de elección en todos los casos.

De los 7 genotipos descritos hasta la fecha para el VHA, sólo los genotipos I, II, III y VII se han aislado de seres humanos. El genotipo I es el más frecuente a escala mundial, y el genotipo III es también frecuente en España y en todo el ámbito mediterráneo. La vacuna de virus completo inactivado protege de forma eficaz frente a todos los genotipos conocidos. Por el momento, la caracterización molecular de las cepas de VHA carece de utilidad clínica, y sólo resulta útil con fines epidemiológicos en el estudio de brotes.

Hepatitis E

El diagnóstico de la hepatitis aguda por virus de la hepatitis E (VHE) plantea problemas aún no resueltos de forma completamente satisfactoria. Aun cuando esta enfermedad sea muy infrecuente en nuestro medio, los datos generados ya en España la clasificarían como autóctona y de muy probable origen zoonótico, por lo que este agente debe tomarse en consideración en función de las características del paciente. En regiones como la nuestra, la prevalencia de anticuerpos frente al VHE (anti-VHE) en la población general es baja (4-7%), y su mera presencia en un caso sospechoso resulta muy significativa con vistas al diagnóstico etiológico, siempre que se hayan descartado

ya otros agentes. No obstante, el problema reside en la especificidad de las técnicas disponibles, que parece no ser muy satisfactoria. En ese sentido, hay un método de *immunoblot* disponible en el mercado que permite detectar separadamente la presencia de anti-VHE de las clases IgG e IgM, y que muestra una especificidad superior a la de otros métodos con los que se ha comparado⁸.

Así pues, es conveniente que el diagnóstico serológico de la hepatitis E aguda, en ausencia de antecedente reciente de viaje a un área endémica, se confirme mediante técnicas moleculares de detección de virus. Tal conveniencia se justifica no sólo desde el punto de vista asistencial, sino también por la necesidad de generar más datos que permitan conocer mejor la realidad epidemiológica de esta infección. Hay métodos de PCR basados en la amplificación de secuencias de las regiones ORF1 y ORF2 del genoma viral que pueden utilizarse con éxito en suero con fines de diagnóstico^{9,10}, y el uso conjunto de estos métodos y de los métodos de detección de IgM específica permite identificar casos de hepatitis E aguda que rinden resultados negativos en estos últimos, quizá debido a que la toma de esas muestras se realizó durante el período de ventana serológica. En cualquier caso, parece recomendable usar conjuntamente ambas aproximaciones si se desea mejorar el rendimiento del diagnóstico de laboratorio de esta enfermedad.

Hasta la fecha, se han descrito 4 genotipos del VHE, y las cepas aisladas de pacientes del Mediterráneo europeo y de los Estados Unidos pertenecen al genotipo 3, el único encontrado hasta ahora en animales de granja en esas regiones. En España, todas las infecciones humanas autóctonas en las que se ha identificado el genotipo viral, y todas las que se han detectado en las granjas de cría de ganado porcino, han respondido, hasta hoy, a cepas de ese genotipo. Por el momento, no se conoce bien el impacto que pueda tener esta diversidad genética en la eficacia de las técnicas de diagnóstico molecular.

Hepatitis virales de transmisión parenteral

Hepatitis C

Infección primaria aguda

La hepatitis aguda por el VHC es una entidad clínica de estudio muy infrecuente, ya que la inmensa mayoría de las infecciones primarias agudas por este virus parecen ser completamente subclínicas o manifestar síntomas muy inespecíficos, que no mueven a realizar estudios de diagnóstico etiológico. Por tanto, y al margen de algunos pocos casos esporádicos, el diagnóstico de la primoinfección aguda por VHC sólo se plantea en pacientes controlados y considerados en riesgo especial de experimentar la infección, que son sometidos a controles específicos con regularidad. Aun cuando la transmisión del VHC en las unidades de hemodiálisis se ha reducido drásticamente, estos pacientes siguen siendo el colectivo que demanda más el diagnóstico de esta situación poco usual.

El control sistemático de las donaciones de sangre mediante técnicas moleculares de detección del VHC constituye otra fuente adicional de identificación de primoinfecciones agudas, y requiere el concurso del microbiólogo pa-

ra su confirmación definitiva. En estos casos, la labor se ve facilitada por el hecho de que estas infecciones corresponden al período de ventana que precede a la aparición de valores detectables de anticuerpos específicos en suero, por lo que basta con tomar una nueva muestra algunas semanas más tarde para poner de manifiesto la seroconversión. Es en este período cuando las técnicas de detección directa de virus ofrecen la única alternativa útil para el diagnóstico de la hepatitis C aguda, entre las cuales las de diagnóstico molecular son las más utilizadas. Independientemente de cuál sea su sensibilidad analítica (umbral de detección), la sensibilidad clínica de estas técnicas es siempre elevada, dado que la viremia acostumbra a ser ya especialmente alta ($> 10^6$ U/ml) cuando se presenta la ictericia y/o la elevación de los valores séricos de aminotransferasas. La detección de antígeno mediante métodos convencionales de inmunoanálisis proporciona, también, el diagnóstico de esta situación con un rendimiento similar al de las técnicas de diagnóstico molecular.

No obstante, lo más frecuente será que la muestra que llega al microbiólogo en demanda de estudios de diagnóstico corresponda a una fase algo más tardía, cuando los anticuerpos específicos ya son detectables en el suero. En esa fase, las técnicas moleculares rendirán siempre resultados positivos, pero no aportarán nada que indique específicamente que el paciente presente una primoinfección aguda por el VHC. La detección de cambios en el patrón de anticuerpos obtenido por *immunoblot* (seroconversión para algunos antígenos en el seguimiento) y, muy especialmente, la detección de IgG específica de baja avididad proporcionan, sin embargo, el diagnóstico mediante serología.

Infección crónica

La persistencia del VHC se acompaña siempre de la producción sostenida de anticuerpos específicos (anti-VHC), si bien hay algunas excepciones que hacen posible que un paciente que tenga una hepatitis C crónica no presente anticuerpos detectables en su suero y sólo pueda ser diagnosticado mediante métodos moleculares. En los pacientes hemodializados, esta situación no es infrecuente y suele ser meramente aparente, ya que combinando diferentes técnicas de *immunoblot* se pone con mucha frecuencia de manifiesto la presencia de anti-VHC, si bien con patrones parciales que suelen situarse dentro de lo que se entiende por "resultados indeterminados". En los pacientes que presentan procesos hematológicos malignos, y en los inmunodeficientes primarios, el déficit en la respuesta inmunitaria humoral específica puede ser más pronunciado y más permanente. En los pacientes coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el espectro es muy amplio, e incluye casos esporádicos de total ausencia de anti-VHC a nivel detectable. En todos estos casos, el diagnóstico etiológico de la hepatitis C crónica debe incluir el uso sistemático de métodos moleculares.

El suero y el plasma son las muestras de elección, y los métodos aplicables son diversos, sin que haya una base para recomendar ninguno en concreto con carácter general. En principio, cualquier método que tenga un umbral de detección no superior a 500 U/ml satisfará razonablemente las necesidades del diagnóstico, si bien trabajar con los umbrales más bajos (< 10 U/ml) puede aumentar ligeramente la sensibilidad clínica. En este sentido, los métodos de RT-PCR en tiempo real y los de amplificación

mediada por transcripción (TMA) ofrecen alternativas muy prácticas y muy sensibles, aunque con el inconveniente de no generar, a diferencia de la RT-PCR anidada, productos finales que puedan utilizarse posteriormente con fines de caracterización molecular, lo que puede ser importante para algunos laboratorios.

Se estima que un 20-25% de las personas que se infectan por el VHC son capaces de desarrollar una respuesta inmunitaria que consigue erradicar completamente el virus, y así se evita la infección persistente. Esto significa que un porcentaje no despreciable de los pacientes que presentan anti-VHC en suero no se hallan crónicamente infectados, y que su suero resulta, por tanto, siempre negativo en las pruebas de diagnóstico molecular. En consecuencia, estas técnicas no deben utilizarse por sí solas para juzgar la especificidad de los resultados positivos que se obtengan en las técnicas de detección de anti-VHC, sobre todo porque es perfectamente posible que un paciente presente anti-VHC en suero y sea persistentemente negativo en las pruebas de detección de genoma viral.

A partir del estudio de tejido hepático y/o de células blancas de sangre periférica mediante técnicas moleculares, se ha descrito la presencia del genoma del VHC en pacientes con alteraciones de la bioquímica hepática, en los que no puede detectarse la presencia de anticuerpos específicos, ni de genoma viral en suero. Esta situación, observada en pacientes sin ninguna condición reconocible que explique la ausencia de respuesta inmunitaria humoral específica y la ausencia de viremia, ha recibido el nombre de "hepatitis C oculta"¹¹. Aunque la casuística aportada por el único grupo que ha informado hasta la fecha sobre este fenómeno es amplia, aún hay muchos interrogantes que despejar antes de admitir que el diagnóstico etiológico de la hepatitis C crónica pueda requerir, realmente, el uso de técnicas de diagnóstico molecular en células de sangre periférica o en tejido obtenido por biopsia¹². A día de hoy, este tipo de estudios sólo deben contemplarse en el contexto controlado de la investigación clínica.

Inicio y seguimiento del tratamiento antiviral

El tratamiento combinado con interferón pegilado y ribavirina ha mejorado notablemente los resultados del tratamiento de la hepatitis C crónica, y ha elevado las tasas de respuesta sostenida por encima del 80% en ciertos grupos de pacientes. A la hora de elegir la pauta terapéutica, las recomendaciones actuales aconsejan considerar 2 características de la cepa de virus causante de la infección: su nivel de replicación, medido en términos de nivel de viremia (carga viral en suero), y su genotipo/genosubtipo.

La cuantificación de la viremia, o estimación de la carga viral en suero, puede realizarse mediante métodos de RT-PCR, PCR en tiempo real, métodos basados en TMA y métodos de hibridación molecular con amplificación de la señal (técnicas de *branched*-DNA [b-ADN]). Cualquiera de ellos resulta adecuado, aunque la PCR en tiempo real parece ir imponiéndose. La existencia de un estándar de la Organización Mundial de la Salud para el ARN del VHC permite expresar los resultados en unidades internacionales/ml (U/ml) por referencia a él, con independencia de la técnica utilizada. Aunque algunos protocolos consideran que el valor absoluto de la carga viral inicial es importante para establecer la pauta terapéutica en los pacientes infectados con cepas del genosubtipo 1b, el

principal objetivo de las pruebas moleculares cuantitativas es registrar un descenso significativo de la viremia dentro de las primeras 12 semanas tras el inicio del tratamiento¹³, y es en esas tareas de comparación en las que las técnicas de cuantificación rinden de un modo más satisfactorio.

Las experiencias de control de calidad muestran, por el contrario, que la capacidad de esas técnicas para proporcionar valores absolutos de carga viral fiables y reproducibles en una muestra clínica es limitada¹⁴, lo que hace, en nuestra opinión, recomendable que los resultados se informen en términos de mero orden de magnitud (p. ej., 3×10^5 U/ml), y que incluyan información que permita valorar el resultado en función de la precisión del método (p. ej., $\pm 0,5$ log). A la luz de los datos actuales, pensamos que informar directamente el resultado cuantitativo, tal como suele ser presentado por estas técnicas (p. ej., 35.260 U/ml), da lugar a una percepción falsa de las capacidades reales de los métodos de laboratorio y puede inducir a errores de interpretación durante el seguimiento del paciente.

En España, las cepas de VHC del genotipo 1b son, globalmente, las prevalentes entre los portadores crónicos. Sin embargo, se ha puesto de manifiesto la penetración paulatina en la población de cepas pertenecientes a los genotipos 1a, 3 y 4, que alcanzan ya prevalencias muy significativas, superiores en conjunto a la del genotipo 1b, entre los portadores más jóvenes¹⁵. La genotipificación de la cepa de VHC resulta, por tanto, aún más importante hoy que ayer, con vistas a la instauración del tratamiento antiviral, ya que la diversidad de genotipos entre los pacientes portadores es creciente.

El método más utilizado hasta la fecha en el ámbito asistencial para genotipificar cepas de VHC ha sido el Li-PA. Este método viene cubriendo bien las necesidades asistenciales desde hace años, aunque ha presentado 2 problemas: a) la clasificación ocasional de algunas cepas del genotipo 1a como genotipo 1b, por causa de semejanzas en las secuencias de la región 5' no codificante (5'-NC) del genoma viral, y b) la generación de respuestas de baja intensidad al trabajar con productos de amplificación obtenidos mediante métodos de RT-PCR simple, con las consiguientes dificultades para la lectura y la interpretación de los resultados.

Para resolver el primer problema, recientemente se ha modificado la prueba con la inclusión de una colección de sondas correspondientes a la región *core*, diseñadas específicamente para una mejor diferenciación de los genotipos 1a y 1b. Toda vez que esto exige realizar una amplificación ad hoc mediante RT-PCR con una combinación de iniciadores de las regiones 5'NC y *core* del genoma, el segundo problema queda también resuelto, ya que no permite el uso de productos de amplificación procedentes de otros métodos. Esto último puede ser, al tiempo que la solución a un problema, un inconveniente práctico. Sin embargo, el uso creciente de métodos de PCR en tiempo real y de TMA para el diagnóstico y para la cuantificación de la viremia van restándole importancia, ya que esas técnicas no generan productos susceptibles de ser estudiados mediante técnicas de caracterización molecular debido a su pequeño tamaño. Por otra parte, se están desarrollando métodos de PCR en tiempo real que serán capaces de identificar el genotipo viral, y que constituirán

una alternativa práctica al LiPA, si se demuestra que sean igualmente eficaces que éste en identificar genotipos y genosubtipos.

En el VHC, la identificación del genotipo puede lograrse también de forma eficaz secuenciando fragmentos de ADN complementario de menos de 300 pares de bases de longitud, lo que permite que la secuenciación sea un procedimiento útil y práctico en el medio asistencial si se automatiza y se facilitan las herramientas informáticas necesarias para el análisis de las secuencias. De hecho, es-

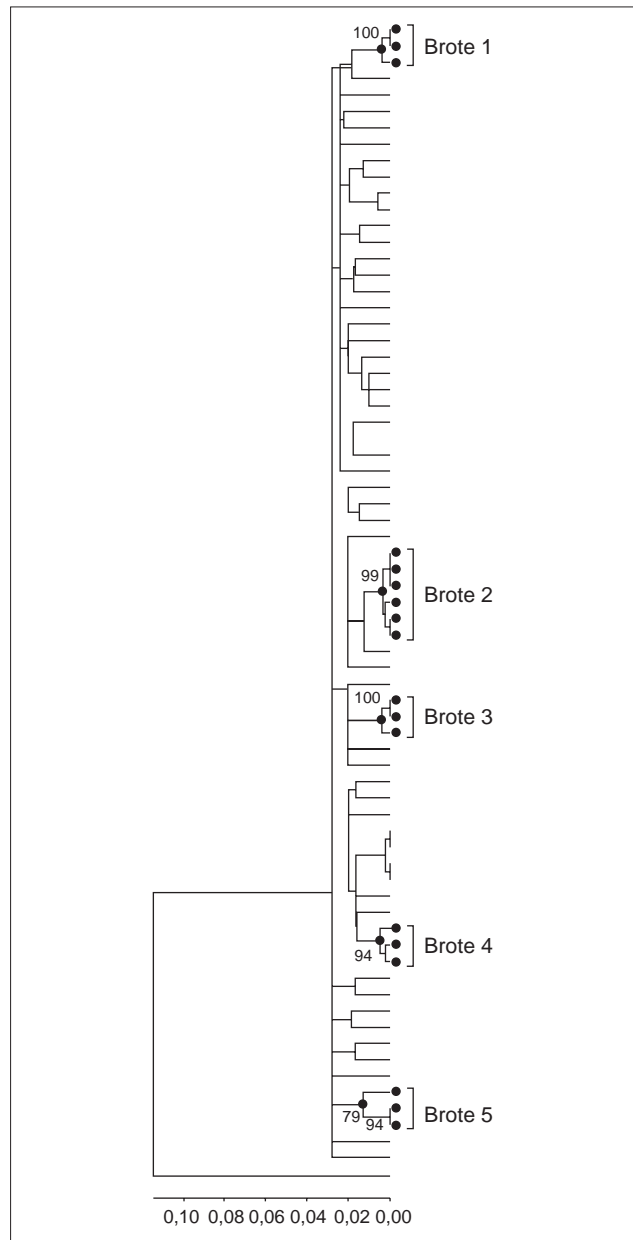


Figura 1. Árbol filogenético resultante del análisis de la secuencia de un fragmento de la región NS5B del genoma de diferentes cepas del virus de la hepatitis C, genosubtipo 1b. Los puntos negros localizan las cepas involucradas en 5 brotes nosocomiales de infección, que forman cada uno un agrupamiento único en el árbol (método: N-J, nt 1st+2nd+3rd+NC, Maximum Composite Likelihood, Bootstrap Reps = 1.000, MEGA 4.0).

ta aproximación suele resolver sin dificultad las indeterminaciones que aún genera el LiPA, sin ir más allá de secuenciar y analizar un fragmento corto de la región NS5B del genoma, aunque es necesario utilizar iniciadores de reacción optimizados para cada genotipo, si se desea trabajar con una sensibilidad satisfactoria para todos ellos. No obstante, la penetración de estas técnicas en el laboratorio de diagnóstico se ve poco favorecida por el hecho de que el análisis de las secuencias no proporciona, por el momento y como veremos a continuación, ninguna otra información de utilidad clínica.

Aun cuando la eficacia del tratamiento antiviral en la hepatitis C crónica haya aumentado mucho, dista todavía de ser óptima. Un porcentaje aún significativo de los pacientes tratados no responde al tratamiento, o recae tras una respuesta transitoria a éste, sin que se hayan podido identificar claramente los motivos de estos fracasos. A diferencia de lo que sucede con el VHB, las bases moleculares de la resistencia del VHC al tratamiento antiviral actual (interferón pegilado más ribavirina) son muy poco conocidas, y los fenómenos de resistencia no pueden ser predichos ni detectados de forma temprana mediante estudios moleculares. Esto limita, por el momento, la utilidad de ese tipo de estudios en el seguimiento de los pacientes tratados. El desarrollo de nuevos antivirales, más eficaces y con mecanismos de acción mejor conocidos, podría cambiar esta situación en un futuro no lejano¹⁶.

Por último, los brotes nosocomiales de infección por el VHC continúan produciéndose en los centros asistenciales, y su estudio es importante por razones diversas. Tras las medidas arbitradas para mejorar la seguridad viral de los hemoderivados y de los procedimientos de la hemodiálisis, los brotes que aún se producen tienen su origen, principalmente, en el uso de viales multidosis de ciertos medicamentos inyectables de uso hospitalario y en la desatención ocasional de las medidas preventivas por parte del personal sanitario. Por lo demás, la atención dental continúa apareciendo en los estudios epidemiológicos como un factor de riesgo significativo para la adquisición de la infección, pero esos datos no han cristalizado nunca en la identificación de mecanismos concretos que avalen esa asociación, sobre todo porque el VHC es un agente fácil de inactivar mediante los procedimientos de uso común en ese medio sanitario.

En el estudio de esos brotes, la caracterización de la avidéz de la IgG anti-VHC y la secuenciación directa de fragmentos cortos (400-450 pares de bases) de la región NS5B son herramientas suficientes para obtener datos muy significativos en apoyo de la investigación epidemiológica (fig. 1). En brotes muy amplios, y en el caso de que se requieran investigaciones de carácter forense en asistencia al poder judicial, la caracterización completa del brote puede requerir el estudio y la comparación de secuencias correspondientes a regiones del genoma más variables y de evolución más rápida, como es la que codifica por los epitopos involucrados en la neutralización por anticuerpos (región hipervariable, ubicada en el extremo 5' de la región E2 y en el extremo 3' de la región NS1). Estos estudios requieren clonar los fragmentos amplificados y secuenciar un número de clones de cada paciente que satisfaga las necesidades del análisis filogenético posterior, lo que alarga de forma considerable el tiempo del estudio e incrementa de forma muy significativa sus costes.

Hepatitis B

Infección primaria aguda

La infección primaria aguda por el VHB se diagnostica mediante la detección conjunta del HBsAg y de anticuerpos específicos de la clase IgM frente al antígeno *core* del virus (IgM anti-HBc) en suero. Los métodos moleculares para el diagnóstico de la infección aguda por VHB son, sin embargo, de utilidad cuando se trata de diagnosticar la infección durante el período de ventana que precede a la aparición del HBsAg en suero a valores detectables (de 2-4 semanas), y de confirmar los raros casos en los que el HBsAg es ya positivo cuando la IgM anti-HBc aún no lo es (casos con HBsAg aislado). Este uso cobra, además, especial relevancia en el cribado de las donaciones de sangre y en el control de las mezclas de plasma destinadas a la producción de hemoderivados. En un estudio reciente realizado en España, las unidades de sangre donadas durante dicho período ventana se detectaron con una frecuencia algo superior a 1/17.000², superior a la frecuencia teórica estimada previamente mediante modelos matemáticos a partir de los datos de prevalencia disponibles. Para este uso, la sensibilidad de las técnicas debe ser elevada, y los métodos de TMA y de PCR a tiempo real aplicables al estudio de unidades de sangre individuales son los de elección.

Infección crónica

Genotipos y subtipos antigénicos

El VHB es un virus que presenta una variabilidad genética elevada¹⁷. Esta variabilidad responde, en gran medida, a la ausencia de una actividad de reparación de errores en la RT, y se traduce en una gran variedad de genotipos, genosubtipos (agrupamientos separados dentro de un genotipo) y subtipos antigénicos que derivan de fenómenos acumulados de selección natural sobre las variantes que se generan. Cinco de los 8 genotipos del VHB descritos hasta la fecha (genotipos A-H) muestran una clara restricción geográfica, por lo que su determinación aporta información valiosa para la epidemiología. Por el contrario, los genotipos A, D y C, y muy especialmente los 2 primeros, presentan distribuciones geográficas más amplias, y su mera identificación resulta menos informativa. La información que aporta la identificación del subtipo antigénico asociado a cada cepa ayuda, sin embargo, a trazar mejor su origen concreto, con la introducción de un elemento que ayuda a diferenciar entre sí, en función de su origen geográfico, cepas que pertenecen a un mismo genotipo. Así, esta asociación genotipo-subtipo antigénico define diferentes grupos genoantigénicos dentro del conjunto de las cepas del VHB que circulan en el mundo.

En España, los grupos genoantigénicos prevalentes son D/ayw2, D/ayw3 y A/adw2. Además, las cepas F/adw4, originarias de América, muestran una prevalencia significativa entre la población autóctona, cuyo origen está en las estrechas relaciones históricas entre España y el continente americano, y algunas cepas características de África (A/ayw1, E/ayw4) parecen también estar penetrando en ella. Por lo demás, las cepas de los genotipos B y C del VHB han llegado ya a España a través de los numerosos inmigrantes procedentes de países de Extremo Oriente, en los que el virus muestra una endemia alta.

La descripción de nuevos genotipos y genosubtipos en el VHB requiere el estudio completo del genoma viral¹⁸, pero la determinación de tipos ya conocidos puede realizarse estudiando fragmentos cortos de la región S/POL que incluyan, además de las secuencias que codifican el determinante antigénico común del HBsAg (determinante "a"), aquellas que codifican los determinantes de subtipo y/d y w/r¹⁹. Estos fragmentos pueden estudiarse mediante LiPA para la identificación del genotipo, aunque su secuenciación permite, además, identificar el genosubtipo y predecir el subtipo antigénico, lo que identifica el grupo genoantigénico al que pertenece la cepa. El estudio de la secuencia puede realizarse mediante comparación de ésta con las existentes en las bases de datos de secuencias, como GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), o bien mediante la realización de un árbol filogenético con secuencias consenso (fig. 2). Para la predicción del subtipo antigénico, se traduce la secuencia del fragmento según el ORF S y se identifican los aminoácidos que ocupan las posiciones que definen los determinantes d/y y w/r, así como los subdeterminantes w1-w4. La identificación efectiva del subtipo antigénico sólo puede realizarse mediante inmunanálisis con colecciones de anticuerpos monoclonales de acceso muy difícil.

Actualmente, no hay recomendaciones de tratamiento antiviral específicas en función del genotipo para la hepatitis B crónica, lo que resta interés clínico a la obtención de este dato. Sin embargo, sí se han publicado asociaciones entre algunos genotipos y las distintas formas de evolución clínica de la infección crónica²⁰.

Mutaciones en el gen HBsAg

En los últimos años, han cobrado importancia las variantes estables del VHB que exhiben cambios de aminoácidos en la secuencia del HBsAg. Estas variantes pueden presentar peculiaridades antigénicas, y algunas han originado resultados negativos falsos en uno o varios de los inmunanálisis de detección del HBsAg de uso común en los laboratorios de microbiología²¹. Además, se ha constatado que algunas de ellas pueden escapar a la protección que confiere la vacuna recombinante de uso actual²²⁻²⁴, o pueden ser resistentes al tratamiento con inmunoglobulina específica^{25,26}. Los datos acerca de su prevalencia entre los portadores crónicos son aún muy escasos.

En España, esta prevalencia se ha establecido en el 39%²⁷. Agrupando las sustituciones de aminoácido según su efecto esperable, de acuerdo a publicaciones previas, el 12,5% de los pacientes estudiados presentaba alguna mutación asociada en la bibliografía a fallos en las pruebas de detección del HBsAg (fig. 3). Sin embargo, su efecto real, de acuerdo a los resultados comunicados en dicha publicación, fue muy limitado, y sólo fue significativo para determinadas sustituciones (Gly145Arg), y para algunas de las variantes que exhibían sustituciones múltiples. Los resultados obtenidos en estudios posteriores, realizados con métodos de detección de HBsAg de última generación, han confirmado plenamente esos datos^{28,29}. Por otra parte, el 6,6% de los portadores crónicos presentó sustituciones asociadas a resistencia a la vacuna, y el 9,2% presentó otras sustituciones asociadas a resistencia al tratamiento con inmunoglobulina.

A la vista de estos datos, el análisis molecular del gen que codifica el HBsAg resultaría de interés ante el ha-

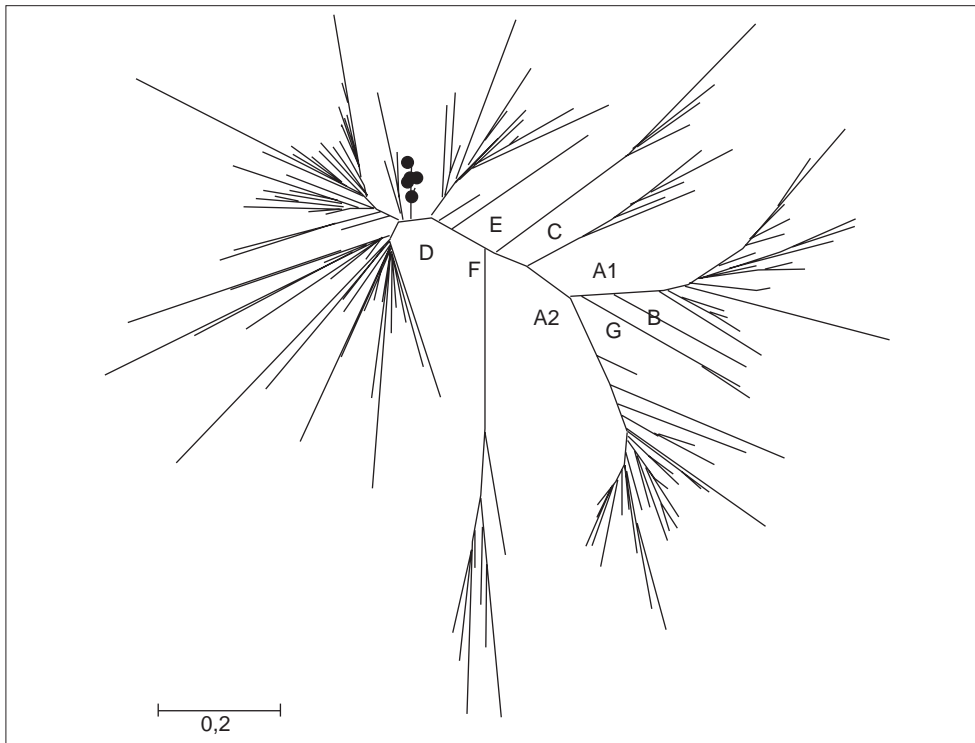


Figura 2. Árbol filogenético (visión radial) resultante del análisis de la secuencia de un fragmento de la región S/POL del genoma de cepas del virus de la hepatitis B (VHB) pertenecientes a diferentes genotipos (método: N-J Kimura 2p). Los puntos negados corresponden a las posiciones ocupadas por 5 cepas de VHB del genotipo D involucradas en un brote epidémico sucedido en deportistas de la especialidad de orientación.

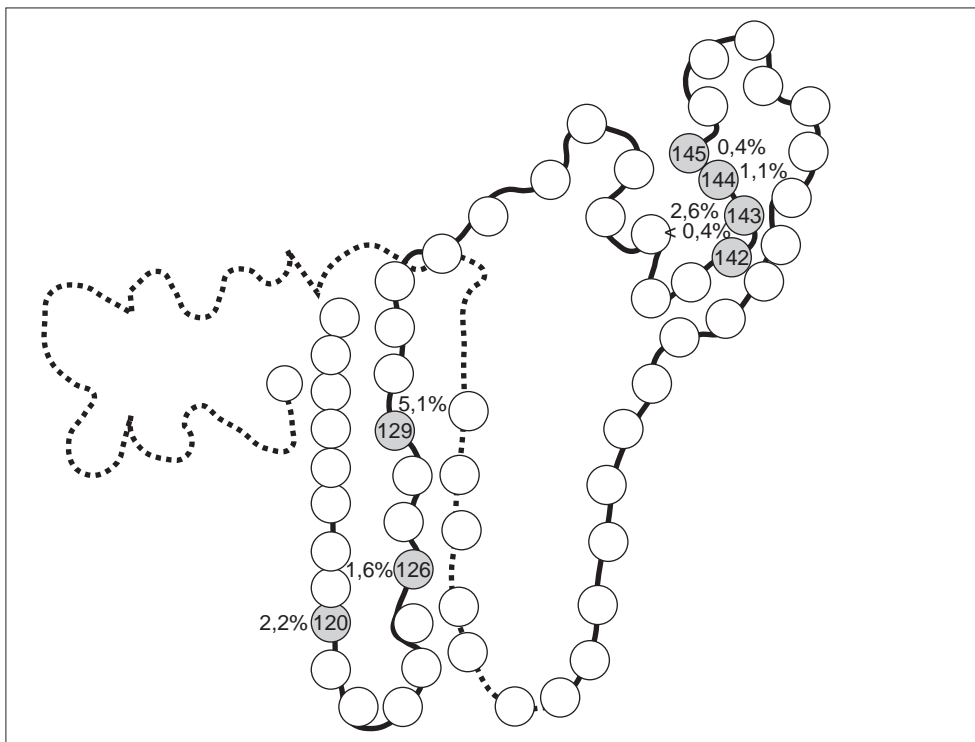


Figura 3. Posiciones en la molécula del antígeno de superficie de la hepatitis B, en las que se han descrito cambios de aminoácido asociados a reactividad reducida o resultados negativos falsos en diferentes inmunoanálisis comerciales para detectar el antígeno. Los porcentajes indican la frecuencia con la que se han detectado esas variantes en portadores crónicos españoles no seleccionados.

llazgo de patrones compatibles con infección crónica por el VHB con HBsAg negativo y ADN viral detectable en suero, en pacientes infectados que tengan antecedente de vacunación, y en pacientes susceptibles de tratamiento preventivo con Ig específica, como los recién nacidos de madres portadoras o los candidatos a trasplante hepático que sean portadores del VHB.

Mutaciones en el promotor básico del gen C y en la región pre-C

La caracterización completa de los portadores crónicos del VHB requiere, en ocasiones, detectar la existencia de mutaciones en el promotor básico del gen C (PBC) y/o las regiones pre-C y C del genoma. El LiPA puede utilizarse para detectar e identificar las mutaciones más fre-

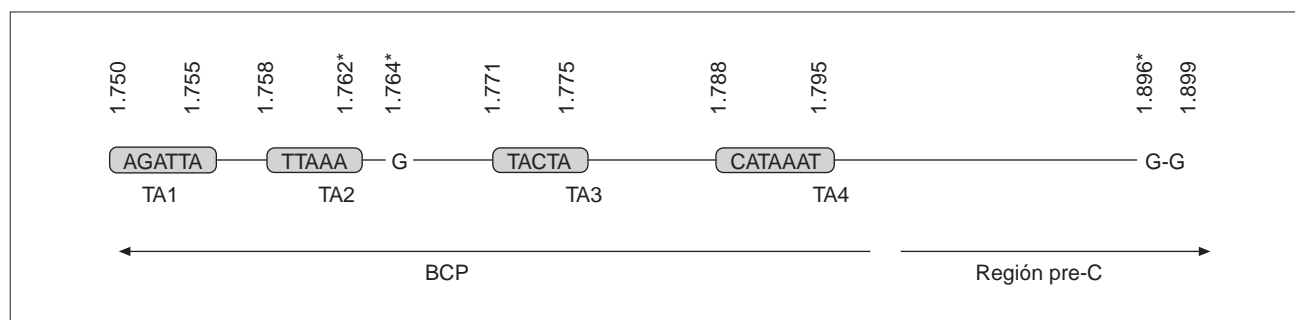


Figura 4. Visión esquemática del promotor básico del gen C (BCP) y de la región pre-C del genoma del virus de la hepatitis B. Se señalan las regiones promotoras de la transcripción (TA1 a 4) y las 2 mutaciones principales descritas en la región pre-C, que dan lugar a una disminución en la producción de ácido ribonucleico pre-C y a codones de parada, respectivamente. Se señala también la mutación principal descrita en el BCP. Las mutaciones en estas regiones provocan la expresión disminuida o nula del antígeno e de la hepatitis B. Con asteriscos se indican las posiciones que pueden detectarse mediante LiPA.

cuentas, pero el estudio exhaustivo de todas las posiciones sólo puede hacerse, a día de hoy, por secuenciación (fig. 4).

Inicio y seguimiento del tratamiento antiviral.

Resistencias

Hay distintas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la infección por el VHB. El objetivo del tratamiento es conseguir la disminución mayor y más duradera de la replicación viral y, entre otros parámetros, el más utilizado para medirla es la cuantificación del ADN viral en suero, mediante técnicas moleculares cuantitativas que ofrezcan una sensibilidad analítica no inferior a 1.000 U/ml, bien por amplificación genómica (PCR a tiempo real) o por hibridación (bADN)²⁰. Sin embargo, la gran capacidad adaptativa del virus mediante mutación-selección condiciona la aparición frecuente de resistencias secundarias a cambios en la ADN polimerasa viral, que es la diana de los tratamientos antivirales actuales.

La sospecha de aparición de esos cambios surge de la observación de un aumento de la carga viral durante el tratamiento, y es esa sospecha la que motiva la búsqueda de dichos cambios. Se han descrito mutaciones asociadas a resistencias al tratamiento en los dominios B (posiciones 173, 180, 181 y 184), C (motivo YMDD, posiciones 202 y 204) y D (posiciones 236 y 250) de la ADN polimerasa/RT viral (tabla 1). La detección de los cambios se puede realizar mediante la técnica LiPA, que tiene la capacidad de detectar simultáneamente distintas poblaciones virales (mutada y no mutada), pero que sólo detecta cambios en ciertas posiciones; o mediante secuenciación directa, que permite identificar mutaciones en cualquier posición del fragmento secuenciado, siempre que formen parte de la población viral mayoritaria.

Estudio de brotes

En el caso del VHB, la elección de la región óptima para los estudios de epidemiología molecular es compleja, debido sobre todo a la presencia de ORF solapados en el genoma viral. Las zonas que sólo codifican para una proteína son, en general, más variables que las zonas de solapamiento (p. ej., gran parte del gen C y parte del gen P). En el análisis de brotes epidémicos, se deben escoger las regiones más variables para realizar los análisis. La identificación del grupo genoantigénico al que pertenece la cepa de cada paciente, según los métodos mencionados más arriba, proporciona una información rápida y de gran interés a la hora de decidir si el brote responde o no a una fuente única de virus, y puede ser muy útil para diseñar los estudios de laboratorio posteriores.

Hepatitis D

Debido a su baja prevalencia entre la población de nuestro entorno, la mera detección de anticuerpos específicos frente al virus de la hepatitis D (VHD) (anti-VHD) en un paciente positivo para HBsAg posee un significado diagnóstico muy elevado. En un paciente con evidencia de infección primaria aguda reciente por VHB, tal hallazgo es indicativo de coinfección aguda. En un portador crónico de VHB ya conocido, pero no evaluado previamente, puede reflejar sobreinfección reciente o coinfección crónica, y la detección de IgM anti-VHD suele resolver acertadamente la disyuntiva. En general, la detección del VHD mediante técnicas moleculares carece de utilidad clínica, y no hay técnicas comerciales para realizarla. Para el tratamiento clínico de algunos pacientes crónicamente infectados, puede, no obstante, resultar útil. Cuando es así, la RT-PCR doble anidada constituye la aproximación más común.

TABLA 1. Principales mutaciones del gen Pol (retrotranscripción) asociadas a resistencia a antivirales

Antiviral	Mutaciones de resistencia		
	Dominio B	Dominio C (YMDD)	Dominio D
Lamivudina	V173L, L180M	M204I/V	
Adefovir	A181V		I233V, N236T
Entecavir	T184G	S202I	M250V

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Delgado-Iribarren AEJ, León P. Serología de las hepatitis víricas. 2.ª ed. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2004.
- Gonzalez R, Echevarría JM, Avellón A, Barea L, Castro E. Acute hepatitis B virus window-period blood donations detected by individual-donation nucleic acid testing: a report on the first two cases found and interdicted in Spain. *Transfusion*. 2006;46:1138-42.
- Echevarría JM. Etiología y patogenia de las hepatitis víricas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:45-56.
- Del Pozo D, Cano A, Peña E, Miquel J, Valer M, Alemán S, et al. Hepatitis autoinmune con producción prolongada de anticuerpos IgM frente al VHA. ¿Son fiables los marcadores serológicos para descartar el diagnóstico de hepatitis autoinmune? *Gastroenterol Hepatol*. 2001;24:387-9.
- Mikata R, Yokosuka O, Imazeki F, Fukai K, Kanda T, Saisho H. Prolonged acute hepatitis A mimicking autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2005;11:3791-3.
- Tjon GM, Coutinho RA, Van den Hoek A, Esman S, Wijkmans CJ, Hoebe CJ, et al. High and persistent excretion of hepatitis A virus in immunocompetent patients. *J Med Virol*. 2006;78:1398-405.
- Eisenbach C, Longerich T, Fickenscher H, Schalasta G, Stremmel W, Encke J. Recurrence of clinically significant hepatitis A following liver transplantation for fulminant hepatitis A. *J Clin Virol*. 2006;35:109-12.
- Echevarría JM. Identificación de casos de hepatitis E aguda mediante detección de anticuerpos específicos de las clases IgG e IgM por inmunoblot recombinante. *Med Clin (Barc)*. 2006;126:238-9.
- Rutjes SA, Lodder WJ, Bouwknegt M, De Roda Husman AM. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J Virol Methods*. 2007;143:112-6.
- Zhao C, Li Z, Yan B, Harrison TJ, Guo X, Zhang F, et al. Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China. *J Med Virol*. 2007;79:1966-73.
- Carreño V. Occult hepatitis C virus infection: a new form of hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2006;12:6922-5.
- Lerat H, Hollinger FB. Hepatitis C virus (HCV) occult infection or occult HCV RNA detection? *J Infect Dis*. 2004;189:3-6.
- Fried MW. Viral factors affecting the outcome of therapy for chronic hepatitis C. *Rev Gastroenterol Disord*. 2004;4:S8-S13.
- Valentine-Thon E. Quality control in nucleic acid testing—where do we stand? *J Clin Virol*. 2002;25:S13-S21.
- Echevarría JM, León P, Pozo F, Avellón A. Follow-up of the prevalence of hepatitis C virus genotypes in Spain during a nine-year period (1996-2004). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2006;24:20-5.
- Timm J, Roggendorf M. Sequence diversity of hepatitis C virus: implications for immune control and therapy. *World J Gastroenterol*. 2007;13:4808-17.
- Echevarría JM, Avellón A. Hepatitis B virus genetic diversity. *J Med Virol*. 2006;78:S36-S42.
- Norder H, Couroucé AM, Coursaget P, Echevarría JM, Lee SD, Mushahwar IK, et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology*. 2004;47:289-309.
- Echevarría JM, Avellón A, Magnius LO. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by limited sequencing. *J Med Virol*. 2005;76:176-84.
- Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, et al. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology*. 2008;134:405-15.
- Gerlich WH. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants—a consensus report of an expert meeting. *Intervirology*. 2004;47:310-13.
- Carman WF, Van Deursen FJ, Mimms LT, Hardie D, Coppola R, Decker R, et al. The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa, and Sardinia. *Hepatology*. 1997;26:1658-66.
- He C, Nomura F, Itoga S, Isobe K, Nakai T. Prevalence of vaccine-induced escape mutants of hepatitis B virus in the adult population in China: a prospective study in 176 restaurant employees. *J Gastroenterol Hepatol*. 2001;16:1373-7.
- Oon CJ, Lim GK, Ye Z, Goh KT, Tan KL, Yo SL, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore. *Vaccine*. 1995;13:699-702.
- Liu CJ, Kao JH, Shau WY, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Naturally occurring hepatitis B surface gene variants in chronic hepatitis B virus infection: correlation with viral serotypes and clinical stages of liver disease. *J Med Virol*. 2002;68:50-9.
- Roznovsky L, Harrison TJ, Fang ZL, Ling R, Lochman I, Orsagova I, et al. Unusual hepatitis B surface antigen variation in a child immunised against hepatitis B. *J Med Virol*. 2000;61:11-4.
- Avellón A, Echevarría JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol*. 2006;78:24-36.
- Echevarría JM, Avellón A. Improved detection of natural hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) mutants by a new version of the VITROS(R) HBsAg assay. *J Med Virol*. 2008;80:598-602.
- Mühlbacher A, Weber B, Burgisser P, Eiras A, Cabrera J, Louisirirothchanakul S, et al. Multicenter study of a new fully automated HBsAg screening assay with enhanced sensitivity for the detection of HBV mutants. *Med Microbiol Immunol*. 2008;197:55-64.