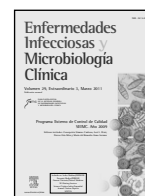




# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



## Infección oculta por el virus de la hepatitis C

Vicente Carreño García\*, Javier Bartolomé Nebreda, Inmaculada Castillo Aguilar y Juan Antonio Quiroga Estévez

Fundación para el Estudio de las Hepatitis Virales, Madrid, España

**Palabras clave:**  
Infección oculta  
ARN-VHC  
Anti-core VHC  
CMSP

### RESUMEN

La infección oculta por el virus de la hepatitis C (VHC) se caracteriza por la detección del ARN-VHC en hígado en ausencia de anti-VHC y de ARN-VHC en suero determinados mediante técnicas convencionales. El desarrollo de un nuevo EIA para la detección de anticuerpos frente a un epítipo conservado de la proteína core del VHC junto con la determinación del ARN-VHC en células mononucleares de sangre periférica y en suero tras concentrar las partículas virales mediante ultracentrifugación, permite diagnosticar a más del 90% de los pacientes con infección oculta por VHC sin necesidad de realizar una biopsia hepática. El daño histológico causado por la infección oculta por VHC comprende desde cambios mínimos hasta cirrosis y carcinoma hepatocelular, aunque en general es una enfermedad más benigna que la hepatitis crónica C clásica. Se ha detectado una prevalencia significativa de infección oculta por VHC en grupos de riesgo como pacientes en hemodiálisis y familiares de pacientes diagnosticados de hepatitis C oculta. Además, esta infección oculta puede darse en sujetos sin evidencias clínicas ni bioquímicas de enfermedad hepática.

© 2010 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

**Keywords:**  
Occult infection  
HCV-RNA  
Anti-core HCV  
PBMC

### Occult hepatitis C virus infection

#### ABSTRACT

Occult hepatitis C virus (HCV) infection is characterized by the detection of HCV-RNA in liver in the absence of anti-HCV and serum HCV-RNA determined by conventional techniques. The development of a new enzyme immunoassay for the detection of antibodies against a conserved epitope in the HCV core protein, together with the detection of HCV-RNA in peripheral blood mononuclear cells and in serum after concentrating the viral particles by ultracentrifugation, allow diagnosis of more than 90% of patients with occult HCV without the need to perform a liver biopsy. Histological damage in occult HCV infection ranges from minimal changes to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, although in general this disease is less severe than classical chronic hepatitis C. A significant prevalence of occult HCV infection has been identified in risk groups such as hemodialysis patients and the family members of patients with occult hepatitis C. This occult HCV infection can also be found in subjects without clinical or biochemical evidence of liver disease.

© 2010 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

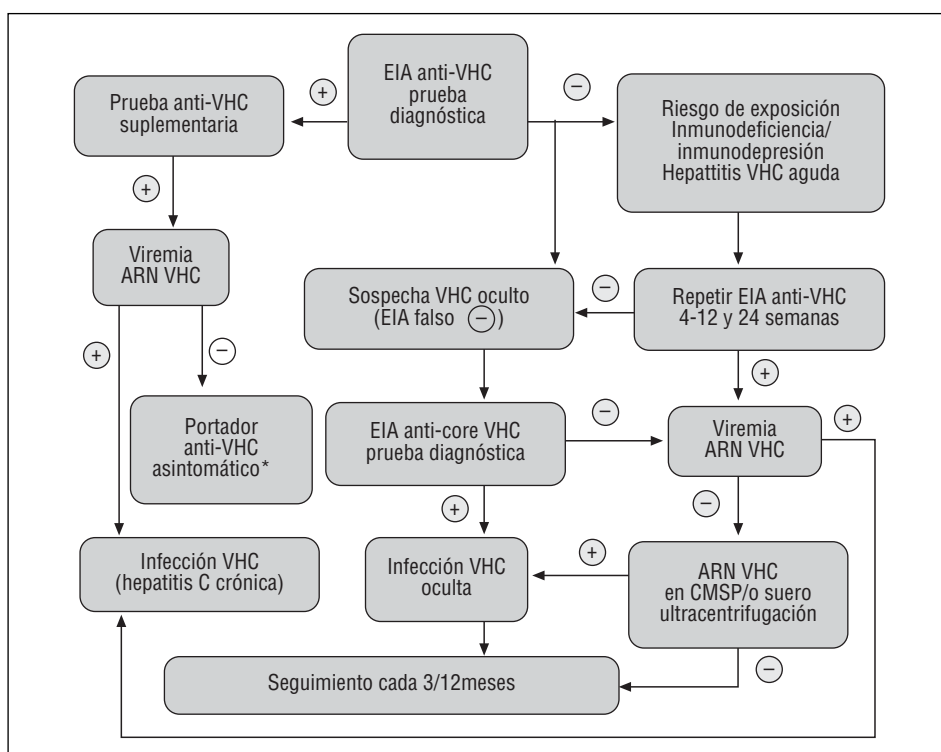
### Introducción

El virus de la hepatitis C (VHC) pertenece al género *Hepacivirus* dentro de la familia *Flaviviridae* y su genoma es un ARN de polaridad positiva (cadena genómica) que se replica mediante la síntesis de una cadena de ARN complementaria de polaridad negativa, llamada cadena antígenómica<sup>1</sup>. Se calcula que en el mundo hay unos 170 millones de personas infectadas crónicamente por el VHC, siendo la principal causa de daño hepático incluyendo la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular<sup>2</sup>.

Durante el ciclo replicativo del virus se sintetizan las diferentes proteínas estructurales (core o nucleocápside y envuelta) y no estructurales (NS) que poseen diversas funciones, frente a las cuales se desarrollan anticuerpos específicos. La detección de anticuerpos frente al VHC (anti-VHC) en una muestra de suero o plasma aporta la primera evidencia de exposición al VHC y constituye la base del diagnóstico serológico de la infección. De todos ellos, los anticuerpos frente a la proteína core y NS3 son los que se detectan de forma más temprana durante la primoinfección aguda por VHC. Aun así, hay un período de ventana cuya duración se estima entre 4 y 12 semanas

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fehvhpa@fehvh.org (V. Carreño García).



**Figura 1.** Esquema diagnóstico de la infección por virus de la hepatitis C (VHC) oculta. \*Se detecta ARN VHC en hígado y CMSP en el 90% de los pacientes<sup>6</sup>.

durante el cuál puede no detectarse la presencia de anti-VHC. Por norma general, una vez desarrollados los anticuerpos frente al VHC permanecen detectables mientras dure la infección viral, ya sea aguda autolimitada o evolucione a la cronicidad. Sin embargo, hay situaciones en las que las pruebas EIA comerciales de cribado diagnóstico no son capaces de detectar la presencia de anti-VHC porque: a) no se desarrollan anticuerpos anti-VHC; b) la seroconversión a anti-VHC es muy tardía o transitoria, pues excepcionalmente se pierde el anti-VHC, es decir, se produce serorreversión, y c) los títulos de anti-VHC que se producen son muy bajos.

Muchas veces depende del sistema inmunológico de la persona que se infecta (se trata de pacientes con inmunodeficiencias o inmunodeprimidos), pero en otras ocasiones se trata de personas inmunocompetentes<sup>3-5</sup> que están o han estado expuestas a pequeñas dosis de VHC de forma esporádica. En estos casos, la determinación de anti-VHC resulta negativa, por lo que es necesario valorar la presencia de factores que pueden motivar la aparición de un resultado EIA anti-VHC negativo. En primer lugar, hay que descartar que se trate de una infección por VHC aguda en fase temprana, que haya una deficiencia inmunológica (p. ej., agammaglobulinemia, coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana [VIH], o enfermedad crónica concomitante), o que haya factores de riesgo de exposición al VHC<sup>2</sup>. De acuerdo con el esquema diagnóstico propuesto en la figura 1, si hay datos clínicos y/o de laboratorio que hagan sospechar una posible infección por VHC debe repetirse la prueba EIA anti-VHC; incluso, se debe solicitar un análisis de ARN-VHC en suero para confirmar la infección por el virus de la hepatitis C. Además de estas causas se debe descartar la presencia de una infección oculta por VHC<sup>6</sup>.

### Infección oculta por el virus de la hepatitis C

En el año 2004 se describió en pacientes con hepatitis crónica de origen desconocido una nueva forma de infección por el VHC a la que se ha denominado infección oculta por VHC<sup>7</sup>. Esta infección oculta se caracteriza porque, aunque los pacientes son anti-VHC y ARN-VHC negativo en suero (determinados por métodos convencionales), en el hígado se detecta la presencia del genoma del VHC, tanto la cadena

genómica (que indica infección por el virus) como la cadena antigénica (que indica replicación viral). Posteriormente se comprobó que también se detecta el ARN-VHC genómico y antigenómico en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en alrededor del 70% de los pacientes con infección oculta por VHC<sup>8</sup>.

Esta infección oculta por VHC se ha descrito no sólo en pacientes con hepatitis crónica de origen desconocido, sino también en otras 2 situaciones clínicas: a) en pacientes anti-VHC positivo pero ARN-VHC negativo en suero y con valores normales de las enzimas hepáticas (portadores "sanos" del VHC)<sup>6,9,10</sup>, y b) en pacientes con hepatitis crónica por virus C que han resuelto la infección (normalización de los valores de transaminasas y pérdida del ARN-VHC en suero), bien de forma espontánea o tras el tratamiento antiviral<sup>11-13</sup>. La presente revisión se centra en la patobiología de la infección oculta por VHC en pacientes con hepatitis crónica de origen desconocido.

### Diagnóstico de la infección oculta por el virus de la hepatitis C

#### Técnicas moleculares

El mejor método para identificar todos los casos de infección oculta por VHC es la detección del ARN-VHC en tejido hepático. Sin embargo, en muchos casos no se dispone de una biopsia hepática para realizar este diagnóstico, por lo que, desde un punto de vista práctico, es necesario disponer de otros abordajes diagnósticos. En este sentido se estudió la utilidad de la determinación del ARN-VHC en plasma, sangre total o CMSP de pacientes con infección oculta por VHC, comprobándose que el ARN viral se detectaba en el 57% de las CMSP y en el 14% de las muestras de sangre total, pero no en el plasma de los pacientes<sup>14</sup>. Estos resultados indican que en los casos en los que no se dispone de biopsia hepática, la determinación del ARN-VHC en CMSP de pacientes con hepatitis crónica de origen desconocido puede ser de utilidad para diagnosticar una infección oculta por VHC.

Tras la descripción inicial de la infección oculta por VHC, diversos grupos han confirmado la existencia de esta infección oculta en hepatitis crónicas de causa desconocida<sup>15-17</sup>, e incluso en sujetos sin

evidencia clínica de padecer una enfermedad hepática<sup>18</sup>. Por el contrario, tan sólo hay un trabajo en que tras analizar CMSP de 22 pacientes con hepatitis criptogénica no se encontró ningún caso con infección oculta<sup>19</sup>. Una posible explicación para que en ninguno de los pacientes estudiados por este grupo se detectase ARN-VHC, es que las muestras de CMSP no se hubieran almacenado y procesado de forma adecuada para evitar así la degradación del ARN que de lugar a falsos negativos<sup>20</sup>. En este sentido hay que señalar que la correcta preservación de las muestras es fundamental para el diagnóstico de la infección oculta, ya que la cantidad de ARN-VHC presente en el hígado y CMSP de estos pacientes es muy baja, lo que dificulta su detección. También, aunque los autores aíslan el ARN total de las CMSP a partir de 1 millón de células, la eficiencia de la extracción del ARN puede variar mucho entre las diferentes muestras, lo cual afecta a la detección del ARN-VHC. Por ello, es importante cuantificar la cantidad del ARN que se aísla para así realizar la PCR con la misma cantidad de ARN total en todos los casos, lo que asegura que un resultado negativo no se debe a que el ARN de partida sea insuficiente o se haya degradado.

Dado que en los pacientes con infección oculta por VHC hay replicación del virus, tanto en el hígado como en CMSP<sup>7,8</sup>, hay que asumir que existe una liberación al torrente circulatorio de partículas virales aunque a tan baja concentración que no es posible detectar el ARN-VHC, incluso utilizando las técnicas más sensibles de PCR. Una forma de aumentar la sensibilidad de la detección del ARN-VHC es la de ultracentrifugar el suero de los pacientes para concentrar las partículas virales circulantes. Para demostrar esta hipótesis se ultracentrifugaron 2 ml de suero de los pacientes sobre un colchón de sacarosa. Tras aislar el ARN total del precipitado se procedió a la determinación del ARN-VHC mediante PCR a tiempo real. De esta manera se comprobó que 61 (59%) de los 106 pacientes con infección oculta por VHC incluidos en el estudio tenían ARN-VHC en suero a muy bajas concentraciones (rango: 8-192 copias/ml)<sup>21</sup>. Además, se pudo demostrar que las características fisicoquímicas de las partículas virales presentes en el suero de los pacientes con infección oculta por VHC eran idénticas a las de las aisladas de pacientes con hepatitis crónica C<sup>21</sup>. Esto indica que el suero de los pacientes con infección oculta por VHC contiene partículas virales con el mismo potencial infectivo que las presentes en el suero de pacientes con hepatitis crónica C. Como ocurre con las CMSP, la detección del ARN-VHC en suero tras la ultracentrifugación es un método alternativo a la biopsia hepática para el diagnóstico de la infección oculta aunque no se consigue identificar el 100% de los casos.

### Serología

De acuerdo con los criterios diagnósticos clásicos, la infección oculta por VHC se puede considerar como un estado de portador de VHC seronegativo<sup>22</sup>. Los pacientes con infección VHC oculta no presentan deficiencia de la respuesta inmunológica, son personas inmunocompetentes en su mayoría; de hecho, es frecuente poder detectar una respuesta celular vigorosa y duradera<sup>23</sup>, y su respuesta inmune humoral no se encuentra alterada. Tan sólo se trata de la situación descrita anteriormente en la cual se producen cantidades muy pequeñas de anti-VHC no detectables por EIA comercial de cribado. El origen más probable es la exposición a pequeñas cantidades de VHC de manera ocasional cuyo resultado es la infección latente y persistente del hígado (y de los CMSP en muchos casos), donde se replica el VHC a valores muy bajos, pero suficientes para mantener un mínimo nivel de estimulación de la respuesta inmunológica.

Por eso, se ha visto dificultado el diagnóstico serológico de la infección oculta por VHC ya que las pruebas EIA anti-VHC comerciales de cribado no muestran suficiente sensibilidad analítica para detectar cantidades traza de anticuerpos anti-VHC<sup>7,24</sup>. Estos EIA comerciales usan una mezcla de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos antigénicos procedentes de diferentes regiones codificantes del

VHC. La naturaleza multiantigénica de los EIA comerciales de cribado facilita la detección de anti-VHC cuando simultáneamente hay suficientes valores de anticuerpos frente a muchos antígenos diferentes. Sin embargo, cuando se producen anticuerpos frente a un antígeno pero no frente a otros y los valores de anti-VHC son muy bajos, lo más probable es que el exceso de proteína "no reactiva" enmascare el reconocimiento de unos pocos epítomos antigénicos: el resultado es que la reactividad de anti-VHC está por debajo del nivel de detección de la técnica empleada. En esta situación se produce un resultado EIA anti-VHC falso negativo. En este sentido, se ha descrito reactividad aislada anti-VHC frente a antígenos inmovilizados en tiras (ensayos suplementarios) en poblaciones de riesgo seronegativas por EIA anti-VHC de cribado<sup>25</sup>. Dichas reactividades pueden equipararse a las seroconversiones monoantígeno descritas en casos de donantes de sangre<sup>26</sup> o en la infección VHC seropositiva clásica<sup>27</sup>.

En este punto es necesario aclarar el criterio de positividad de las pruebas suplementarias. No todas las pruebas suplementarias contienen idénticos antígenos VHC derivados de las mismas regiones codificantes. Tradicionalmente, para considerar positiva una prueba anti-VHC suplementaria del tipo *immunoblot* la muestra (suero o plasma) debía reaccionar con al menos 2 antígenos, preferentemente de 2 regiones diferentes. De lo contrario, se considera como resultado indeterminado la reactividad monoantigénica (es decir, reacción frente a una sola proteína VHC o a 2 antígenos de la misma proteína). En personas inmunocompetentes se estima que alrededor de un 5% de las pruebas suplementarias da un resultado indeterminado, por lo general debido a que se trata de fases tempranas de la primoinfección VHC. Sin embargo, ese resultado puede ser superior al 30% en poblaciones de bajo riesgo como donantes voluntarios de sangre<sup>2</sup>. Este concepto ha quedado superado por la mejora analítica de las pruebas diagnósticas y porque la obtención de un resultado indeterminado no resuelve el motivo por el que se realiza la prueba suplementaria: conocer si el anti-VHC es positivo o negativo. En algunas de las pruebas anti-VHC suplementarias comerciales de tercera generación<sup>28</sup> se ha modificado el criterio de positividad reduciendo así la frecuencia de resultados indeterminados: se acepta como resultado anti-VHC positivo la reactividad intensa monobanda core (bioblot HCV<sup>®</sup> de Biokit) e incluso la reactividad débil simultánea a las 2 bandas core (INNO-LIA HCV Score<sup>®</sup> de Innogenetics), sin que sea necesario observar reactividad frente a otras regiones del VHC (RIBA<sup>®</sup> 3.0 SIA de Chiron-Ortho, Matrix<sup>®</sup> HCV de Abbott y Deciscan<sup>®</sup> HCV Plus de Bio-Rad). Este nuevo criterio ha permitido encajar los patrones serológicos de la infección por VHC, tanto seropositiva como oculta o seronegativa, observados en poblaciones de riesgo intermedio-bajo. Además, se tiene en cuenta la naturaleza serológica de los paneles de seroconversión internacionales que sirven para validar las pruebas analíticas anti-VHC de cribado y suplementarias. Cabe recordar que estos paneles se componen de muestras seriadas de un único donante obtenidas durante el período de seroconversión a anti-VHC, por lo que frecuentemente se observan reactividades monoantígeno en muestras aisladas.

En España se calcula que hay alrededor de 900.000 personas infectadas por VHC, es decir, una tasa del 2%. De ellas, entre el 70 y el 80% son clínicamente asintomáticas. Hasta el 80% de las infecciones VHC seropositivas no se diagnostica por tratarse de colectivos de bajo riesgo<sup>2</sup>. Desde diversas instancias (incluyendo la asociación europea de pacientes hepáticos, ELPa) se ha propuesto realizar un cribado en la población general para identificar las personas VHC seropositivas. Esto permitiría ofrecer consejo clínico para frenar la evolución de la enfermedad así como ayudaría a reducir la tasa de transmisión esporádica del VHC. No obstante, estos esquemas de trabajo aún no tienen en cuenta la infección oculta por VHC y su posible incidencia en poblaciones donde precisamente el desconocimiento frena su erradicación. Por eso, urge disponer de métodos capaces de detectar títulos muy bajos de anticuerpos anti-VHC que pongan de manifiesto la mera exposición al VHC. Esto es especialmente importante en el cri-

bado de donantes de sangre<sup>26,27</sup>, pero también entre colectivos en los que por su naturaleza (hemodializados, usuarios de drogas por vía parenteral, etc.) es frecuente que el diagnóstico serológico sea incompleto o incorrecto<sup>2</sup>.

Con objeto de mejorar la sensibilidad de las pruebas EIA de cribado en la población de personas con infección oculta por VHC, se ha desarrollado recientemente un EIA anti-VHC que utiliza como antígeno un péptido sintético basado en un epítipo inmunodominante de la proteína core del VHC<sup>29</sup>. Las características analíticas (sensibilidad, especificidad) de la prueba EIA anti-core VHC son equiparables a las de las pruebas EIA anti-VHC comerciales de cribado en personas inmunocompetentes de poblaciones de riesgo. En hepatopatías criptogénicas la prueba EIA anti-core VHC presenta una sensibilidad superior, ya que detecta el 40% de las infecciones VHC ocultas que son seronegativas usando EIA anti-VHC comerciales de cribado. Los datos disponibles indican que también es más sensible identificando personas expuestas al VHC en el entorno familiar, con independencia de que el familiar sea VHC seropositivo o tenga una infección oculta por VHC. Además, en pacientes hemodializados inmunodeprimidos, los datos preliminares señalan que también es más sensible detectando exposición al VHC con la consiguiente ventaja de poder evitar la transmisión nosocomial en unidades de diálisis. Se ha propuesto esta prueba EIA anti-core VHC como alternativa al EIA anti-VHC comercial de cribado cuando se sospecha un resultado falso negativo<sup>30</sup>. Es posible aumentar la tasa de detección de anticuerpos anti-core VHC si esta prueba se realiza de forma seriada (seguimiento recomendado en la figura 1), ya que al tratarse de muy pequeñas cantidades de anticuerpos es posible observar fluctuaciones en el entorno del límite de detección. Por otra parte, la prueba EIA anti-core VHC también puede utilizarse como prueba anti-VHC suplementaria para confirmar la presencia de títulos muy bajos de anticuerpos VHC con resultado incierto usando pruebas EIA anti-VHC de cribado.

#### *Manejo diagnóstico de la infección oculta por virus de la hepatitis C*

A pesar de que todos estos ensayos descritos permiten el diagnóstico de la infección oculta por VHC sin necesidad de realizar una biopsia hepática, el uso individual de éstos aún no identifica todos los casos de infección oculta. Por esto se ha realizado un estudio para comprobar si la combinación de la detección del ARN-VHC en CMSP y en suero tras la ultracentrifugación, junto con la determinación del anti-core VHC, permite diagnosticar a todos los pacientes con infección oculta por VHC, evitando así la necesidad de la biopsia hepática<sup>31</sup>. Se incluyó a 122 pacientes diagnosticados de infección oculta por VHC por tener ARN del virus en la biopsia hepática en ausencia de anti-VHC y ARN-VHC en suero. Como grupo control se estudió a 45 pacientes con hepatitis crónica de causa no viral y que eran negativos al ARN-VHC en la biopsia hepática. De todos estos pacientes (con infección oculta y controles) se disponía de suero y CMSP para realizar la determinación de los 3 marcadores de infección oculta (ARN-VHC en CMSP y en suero tras la ultracentrifugación y anti-core VHC). Los 45 pacientes del grupo control fueron negativos a todos los marcadores. En los pacientes con infección oculta por VHC se encontró que el 36% de ellos era anti-core VHC positivo, el 57% tenía ARN-VHC en suero detectable tras la ultracentrifugación y el 61% presentaba el ARN viral en sus CMSP. Combinando los resultados de los 3 ensayos se comprobó que 111 de los 122 pacientes (91%) podían ser diagnosticados de infección oculta por VHC, ya que eran positivos al menos para 1 de los 3 marcadores estudiados. La concentración de ARN-VHC en los hepatocitos era significativamente mayor en los pacientes con infección oculta y que eran positivos simultáneamente a los 3 marcadores que en los pacientes negativos a todos o que habían resultado positivos a 1 o 2 marcadores. En conclusión, la determinación conjunta del anti-core VHC y del ARN-VHC en CMSP y en suero ultracentrifugado permite el diagnóstico de más del 90% de los casos de infección oculta por VHC sin necesidad de realizar una biopsia hepática.

Por último, se ha realizado un seguimiento a largo plazo (media:  $55,7 \pm 20,3$  meses; rango: 23-90 meses) en 37 pacientes con infección oculta por VHC, determinando en ellos cada 4-6 meses la presencia de ARN-VHC, tanto en suero tras la ultracentrifugación como en CMSP (manuscrito en preparación). Todos los pacientes estaban en tratamiento con ácido ursodeoxicólico (15 mg/kg/día) desde el momento de su diagnóstico de infección oculta, debido a que los pacientes tenían valores alterados de alanina aminotransferasa (ALT). A lo largo del seguimiento se detectó la presencia de ARN-VHC en las CMSP de 31 (84%) pacientes, con un patrón intermitente (entre 2 y 5 muestras positivas) en 23 (74%) de los 31 casos (74%), mientras que los otros 8 pacientes sólo presentaron un muestra positiva. De igual manera, tras la ultracentrifugación, se detectó ARN-VHC en el suero de 33 (89%) de los pacientes, siendo detectables estos bajos valores de viremia de forma intermitente (hasta en 5 ocasiones) en 28 (85%) de ellos y en los otros 5 pacientes en una sola muestra durante el seguimiento. En conjunto, tan sólo 1 paciente de los 37 estudiados resultó siempre negativo al ARN-VHC (en CMSP y en suero) durante los 44 meses que duró su seguimiento. Con el tratamiento de ácido ursodeoxicólico, 9 pacientes normalizaron los valores de ALT ( $< 30$  UI/l), en 16 permanecieron constantemente alterados y los 12 restantes presentaron valores fluctuantes de ALT (con valores por encima de la normalidad en diversas ocasiones). De estos 12 últimos pacientes, 10 resultaron positivos al ARN-VHC en suero tras la ultracentrifugación al menos en 2 ocasiones durante el seguimiento, y en 7 de estos 10 pacientes (70%) la detección de la viremia coincidía con el aumento de los valores de ALT por encima de los valores normales. De este trabajo se extraen 2 conclusiones muy importantes: una es que la determinación continuada del ARN-VHC en CMSP y en suero después de la ultracentrifugación identifica cerca del 100% de los pacientes con una infección oculta por VHC, y la otra es que la infección oculta persiste durante años con una replicación activa y liberación de partículas virales al torrente sanguíneo.

#### **Características clínicas de la infección oculta por virus de la hepatitis C**

Para determinar las características clínicas de la infección oculta por VHC se realizó un estudio comparando 69 pacientes con hepatitis crónica C (anti-VHC y ARN-VHC positivo en suero con transaminasas alteradas) frente a 68 pacientes con infección oculta por VHC. Los 2 grupos de pacientes no diferían con respecto a la edad media, el sexo y la duración conocida de la enfermedad<sup>32</sup>. En el trabajo se encontró que los pacientes con infección oculta tenían valores significativamente más altos de colesterol y triglicéridos, pero valores significativamente más bajos de alfa-fetoproteína, hierro, ALT y de gamma-glutamil transpeptidasa. Con respecto a la histología hepática, el número de pacientes con actividad necroinflamatoria y fibrosis era significativamente mayor en la hepatitis crónica C. Sin embargo, el porcentaje de pacientes con cirrosis hepática fue similar en los 2 grupos (el 4% de cirrosis en la infección oculta frente al 7% en la hepatitis crónica C). Por otro lado, el porcentaje de pacientes con esteatosis hepática no difería entre ambos grupos, a pesar de la alta prevalencia de dislipidemias en los casos de infección oculta. Por último, el número de hepatocitos infectados por el VHC (determinado mediante hibridación in situ) era significativamente más bajo en el grupo de infección oculta que en el de los pacientes con hepatitis crónica C. En su conjunto, los datos de este estudio indican que la infección oculta por VHC produce una enfermedad más leve y con menor daño hepático que la infección crónica por VHC, aunque hay que señalar que estos pacientes pueden tener cirrosis hepática.

También se ha comunicado la detección de ARN-VHC en tejido hepático tumoral y no tumoral de pacientes con cáncer de hígado que eran anti-VHC y ARN-VHC en suero negativo y que no tenían ningún otro factor de riesgo conocido para el desarrollo de carcinoma hepatocelular<sup>15,16</sup>. Esto sugiere que la infección oculta por VHC

podría ser también responsable de algunos casos de carcinoma hepatocelular de etiología desconocida aunque es necesario realizar más estudios incluyendo un mayor número de pacientes para confirmar esta hipótesis.

### **Características moleculares de la infección oculta por virus de la hepatitis C**

Hasta la fecha, en los trabajos en los que se ha estudiado el genotipo del VHC se ha encontrado infección oculta causada por los genotipos 1a, 1b y 2a<sup>7,18,21</sup>. Es de esperar que, a medida que se vayan realizando más trabajos sobre la infección oculta por VHC en los que se determine el genotipo del virus implicado en dicha infección, se encuentren infecciones ocultas causadas por otros genotipos del VHC (especialmente en las zonas geográficas donde los genotipos prevalentes de infección por VHC sean distintos a los genotipos 1 y 2).

Dos aspectos no aclarados de la infección oculta por VHC son, por un lado, los valores tan bajos de replicación del virus que se dan en estos pacientes y, por otro, el que a pesar de la existencia de replicación del virus con liberación de partículas virales al torrente sanguíneo (aunque a niveles muy bajos) no se detecten anticuerpos frente a las proteínas virales utilizando los tests comerciales. Una posible explicación para estos fenómenos es que la infección oculta esté causada por virus mutantes que repliquen a muy bajo nivel y que induzcan la producción de anticuerpos frente a nuevos epítomos que no están incluidos en los ensayos comerciales. Sin embargo, cuando se ha secuenciado parcialmente diferentes regiones del genoma del VHC (5' no codificante, core, NS3, NS4 y NS5) aislado de pacientes con infección oculta por VHC, no se han encontrado mutaciones en estas regiones que conlleven una disminución de la transcripción/traducción o den lugar a cambios en las secuencias de las proteínas virales<sup>7,18,21</sup>. Estos datos parecen indicar que los bajos valores de replicación y la ausencia de anticuerpos detectables por los métodos convencionales podrían deberse a factores del huésped.

### **Tratamiento de la infección oculta por virus de la hepatitis C**

Como se ha mencionado anteriormente, la infección oculta por VHC es una enfermedad menos severa que la hepatitis crónica C<sup>32</sup>, aunque los pacientes presentan valores constantemente alterados de las enzimas hepáticas y pueden tener una lesión hepática e incluso cirrosis. Por ello, el tratamiento antiviral podría ser de utilidad en estos pacientes. En este sentido se realizó un estudio de tratamiento en el que se incluyó a 10 pacientes con infección oculta (genotipo 1b), con valores alterados de ALT durante al menos 12 meses, en los que se detectaba ARN-VHC en sus CMSP y que tenían actividad necroinflamatoria en una biopsia hepática realizada en el año previo al comienzo del estudio<sup>33</sup>. Los pacientes se trataron con dosis estándar de interferón pegilado y ribavirina, pero durante 24 semanas en lugar de 48 semanas, que es la pauta habitual de tratamiento de la hepatitis crónica C con genotipo 1b. Se optó por un período de tratamiento más corto debido a que los pacientes eran ARN-VHC negativo en suero (por técnicas convencionales) y porque el porcentaje de hepatocitos infectados por el VHC en la infección oculta es mucho menor que en la infección crónica<sup>32</sup>. Al finalizar la terapia, 8 pacientes normalizaron los valores de ALT y perdieron el ARN-VHC en las CMSP. Sin embargo, tras 24 semanas de seguimiento postratamiento, sólo 3 pacientes mantenían los valores normales de ALT y permanecían ARN-VHC negativo en las CMSP (respondedores completos). En 5 pacientes (2 de ellos respondedores completos) se realizó una segunda biopsia hepática, comprobándose que el ARN-VHC seguía siendo positivo aunque la media de la carga viral en hígado era significativamente menor que la de la biopsia basal. Con respecto al daño histológico, en 2 pacientes (uno era respondedor completo) no se observaron cambios respecto a la biopsia hepática basal, mientras que en los otros 3 la actividad necroinflamatoria y el índice de fibro-

sis habían disminuido. En conclusión, aunque la terapia antiviral en los pacientes con infección oculta por VHC no elimina el virus del hígado, al igual que ocurre en los pacientes con hepatitis crónica C<sup>12,13</sup>, el tratamiento es beneficioso ya que disminuye la carga viral intrahepática y mejora el daño histológico.

### **Infección oculta por virus de la hepatitis C en grupos de riesgo**

Los pacientes en las unidades de hemodiálisis tienen riesgo de infección por los virus B y C de la hepatitis. Por este motivo, a los pacientes en hemodiálisis se les realiza controles serológicos frente a estos virus 2 veces al año y se les determina los valores de enzimas hepáticas cada 2 meses. Durante estos controles se detectan casos con transaminasas alteradas en los que no es posible establecer la causa de dicha alteración. Una posible explicación sería que estos pacientes tuviesen una infección oculta por VHC. Esto se analizó en un estudio multicéntrico en el que participaron 10 unidades de hemodiálisis de toda España y en el que se incluyó un total de 109 pacientes en hemodiálisis que tenían valores de transaminasas alterados pero que no tenían marcadores de infección por el virus B de la hepatitis y eran anti-VHC y ARN-VHC negativo en suero<sup>34</sup>. Dado que de forma rutinaria no se recomienda la realización de una biopsia hepática en los pacientes en hemodiálisis, el diagnóstico de la infección oculta por VHC se realizó mediante la detección del ARN-VHC en CMSP. Se encontró que 49 de los 109 pacientes (45%) eran positivos a este marcador y, además, en un 53% de los pacientes con infección oculta por VHC se detectó replicación del virus en CMSP. Los pacientes con infección oculta llevaban significativamente más tiempo en hemodiálisis y sus valores de ALT durante los 6 meses previos a la inclusión en el estudio eran significativamente más elevados que los pacientes sin infección oculta. Además, durante el seguimiento (una media de 13 meses), el porcentaje de fallecimientos fue significativamente superior en los pacientes con infección oculta por VHC (39%) que en el grupo sin infección oculta (20%). Finalmente, es importante señalar que uno de los pacientes con infección oculta por VHC tuvo que someterse a una laparoscopia y durante ésta se observó que presentaba una cirrosis hepática. El conjunto de estos hallazgos demuestra que hay una elevada prevalencia de infección oculta por VHC en pacientes en hemodiálisis que tienen valores alterados de transaminasas de origen desconocido, por lo que parece conveniente realizar el diagnóstico de la infección oculta por VHC en este tipo de pacientes a fin de evitar la diseminación de la infección en las unidades de hemodiálisis.

La vía principal de adquisición del VHC es la parenteral, aunque en diversos estudios se ha comprobado que también se puede transmitir en el entorno familiar<sup>35,36</sup>. Por ello se estudió la posible transmisión entre los familiares que convivían con pacientes con infección oculta por VHC o con hepatitis crónica C. Se incluyó a 102 familiares de 50 pacientes con infección oculta y a 118 familiares de 59 pacientes con hepatitis crónica C<sup>37</sup>. A todos los familiares se les determinaron los valores de enzimas hepáticas y el anti-VHC y ARN-VHC en suero por métodos convencionales. En 10/102 (9,8%) de los familiares de pacientes con infección oculta se detectó la presencia de ARN viral y/o anti-VHC frente a 4/118 (3,4%) de los familiares de pacientes con hepatitis crónica C. También se encontró que 14 familiares (7 de ellos familiares de pacientes con infección oculta por VHC) tenían valores alterados de las enzimas hepáticas sin marcadores de infección por el virus B de la hepatitis o por el VHC. En los 14 casos, los valores de transaminasas se mantuvieron alterados durante 12 meses y en ese momento 2 de ellos aceptaron someterse a una biopsia hepática. En estos 2 casos (ambos familiares de pacientes con infección oculta) se detectó ARN-VHC en hígado y, por tanto, fueron diagnosticados de infección oculta por VHC. Este hallazgo sugiere que la posibilidad de transmisión intrafamiliar del VHC puede ser mayor a la esperada ya que el virus puede transmitirse de forma oculta y, por tanto, no diagnosticarse esta infección al no ser detectada por los métodos convencionales. En conclusión, tanto

a los familiares que conviven con pacientes con hepatitis crónica C como a los familiares de pacientes con infección oculta por VHC habría que determinarles no sólo los marcadores convencionales del virus, sino también los marcadores descritos en esta revisión (ARN-VHC en CMSP, en suero ultracentrifugado y anti-core VHC) ya que la infección puede transmitirse de forma oculta.

Teniendo en cuenta la prevalencia de la infección oculta por VHC que se ha encontrado en los grupos de riesgo antes mencionados, sería importante estudiar otras poblaciones de riesgo como pacientes con infección por VIH, hemofílicos, usuarios de drogas por vía parenteral, etc.

Mención aparte merece el trabajo realizado en sujetos sin riesgo de infección por VHC y sin evidencias clínicas de enfermedad hepática. Así, De Marco et al<sup>18</sup> estudiaron la presencia de ARN-VHC en CMSP de 276 sujetos sanos sin enfermedad hepática (valores de transaminasas normales y anti-VHC y ARN-VHC en suero negativo), encontrando que 9 de ellos (3,3%) tenían ARN viral en sus CMSP, es decir, una infección oculta por VHC. Esta prevalencia era ligeramente mayor que la de anti-VHC en la población italiana (2,7%). Este trabajo demuestra que puede haber infección oculta por VHC en sujetos sin ninguna evidencia de enfermedad hepática, por lo que se deberían hacer estudios acerca de la infección oculta por VHC en bancos de sangre.

En resumen, los estudios realizados sugieren que la prevalencia global de la infección por VHC debe ser mayor que la estimada si se tiene en cuenta el número de casos con hepatitis crónica C y con infección oculta por VHC, tanto con valores alterados de las transaminasas como con valores normales. Además, los datos más recientes demuestran exposición al VHC en grupos de riesgo intermedio-bajo e incluso entre personas tradicionalmente consideradas sin riesgo de contagio por VHC. La mejor forma de combatir la alta capacidad de transmisión del VHC es disponer de pruebas diagnósticas sencillas y asequibles, y realizar el cribado de la población general para identificar los casos positivos y adoptar medidas profilácticas y terapéuticas eficaces.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol.* 2000; 81:1631-48.
- Ghany MG, Strader DB, Thomas DL, Seef LB. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology.* 2009;49:1335-74.
- Takaki A, Wiese M, Maertens G, Depla E, Seifert U, Liebetrau A, et al. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat Med.* 2000;6:578-82.
- Kondili LA, Chionne P, Costantino A, Villano U, Lo Noce C, Pannozzo F, et al. Infection rate and spontaneous seroreversion of anti-hepatitis C virus during the natural course of hepatitis C virus infection in the general population. *Gut.* 2002;50:693-6.
- Lefrère JJ, Giroit R, Lefrère F, Guillaume N, Lerable J, Le Marrec N, et al. Complete or partial seroreversion in immunocompetent individuals after self-limited HCV infection: consequences for transfusion. *Transfusion.* 2004;44:343-8.
- Carreño V, Pardo M, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, Castillo I. Detection of hepatitis C virus (HCV) RNA in the liver of healthy anti-HCV antibody-positive, serum HCV-RNA negative patients with normal alanine aminotransferase levels. *J Infect Dis.* 2006;194:53-60.
- Castillo I, Pardo M, Bartolomé J, Ortíz-Movilla N, Rodríguez-Iñigo E, De Lucas S, et al. Occult hepatitis C virus infection in patients in whom the etiology of persistently abnormal results of liver-function tests is unknown. *J Infect Dis.* 2004;189:7-14.
- Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Bartolomé J, De Lucas S, Ortíz-Movilla N, López-Alcorocho JM, et al. Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut.* 2005;54:682-5.
- Falcón V, Acosta-Rivero N, Shibayama M, Luna-Muñoz J, Miranda-Sánchez M, Gavilondo J, et al. Evidences of hepatitis C virus replication in hepatocytes and peripheral blood mononuclear cells from patients negative for viral RNA in serum. *Am J Infect Dis.* 2005;1:34-42.
- Radkowski M, Horban A, Gallegos-Orozco JF, Pawelczyk A, Jablonska J, Wilkinson J, et al. Evidence for viral persistence in patients who test positive for anti-hepatitis C virus antibodies and have normal alanine aminotransferase levels. *J Infect Dis.* 2005;15:1730-3.
- Pham TN, MacParland SA, Mulrooney PM, Cooksley H, Naoumov NV, Michalak TI. Hepatitis C virus persistence after spontaneous or treatment induced resolution of hepatitis C. *J Virol.* 2004;78:5867-74.
- Radkowski M, Gallegos-Orozco JF, Jablonska J, Colby TV, Walewska-Zielecka B, Kubicka J, et al. Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2005;41:106-14.
- Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, López-Alcorocho JM, Pardo M, Bartolomé J, Carreño V. Hepatitis C virus replicates in the liver of sustained responder patients to antiviral treatment. *Clin Infect Dis.* 2006;43:1277-83.
- Carreño V, Castillo I, Bartolomé J, Rodríguez-Iñigo E, Ortíz-Movilla N, De Lucas S, et al. Comparison of hepatitis C virus RNA detection in plasma, whole-blood and peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *J Clin Virol.* 2004;31:312-3.
- Esaki T, Suzuki N, Yokoyama K, Iwata K, Irie M, Anan A, et al. Hepatocellular carcinoma in a patient with liver cirrhosis associated with negative serum HCV test but positive liver tissue HCV-RNA. *Intern Med.* 2004;43:279-82.
- Comar M, Dal Molin G, D'Agaro P, Croce SL, Tribelli C, Campillo C. HBV, HCV and TTV detection by in situ polymerase chain reaction could reveal occult infection in hepatocellular carcinoma: comparison with blood markers. *J Clin Pathol.* 2006;59:526-9.
- Zaghloul H, El-Sherbiny W. Detection of occult hepatitis C and hepatitis B virus infections from peripheral blood mononuclear cells. *Immunol Invest.* 2010;39:284-91.
- De Marco L, Gillio-Tos A, Fiano V, Ronco G, Krogh V, Palli D, et al. Occult HCV infection: an unexpected finding in a population unselected for hepatic disease. *PLoS One.* 2009;4:e8128.
- Halfon P, Bourlière M, Ouzan D, Sène D, Saadoun D, Khiri H, et al. Occult hepatitis C virus infection revisited with ultrasensitive real-time PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2008;46:2106-8.
- Madejón A, Manzano ML, Arocena C, Castillo I, Carreño V. Effects of delayed freezing of liver biopsies on the detection of hepatitis C virus RNA strands. *J Hepatol.* 2000;32:1019-25.
- Bartolomé J, López-Alcorocho, Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Quiroga JA, Palacios R, et al. Ultracentrifugation of serum samples allows detection of hepatitis C virus RNA in patients with occult hepatitis C. *J Virol.* 2007;81:7710-5.
- Stapleton JT, Schmidt WN, Katz L. Seronegative hepatitis C virus infection, not just RNA detection. *J Infect Dis.* 2004;190:651-2.
- Quiroga JA, Llorente S, Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Pardo M, Carreño V. Cellular immune responses associated with occult hepatitis C virus infection of the liver. *J Virol.* 2006;80:10972-9.
- Quiroga JA, Castillo I, Pardo M, Rodríguez-Iñigo E, Carreño V. Combined hepatitis C virus (HCV) antigen-antibody detection assay does not improve diagnosis for seronegative individuals with occult HCV infection. *J Clin Microbiol.* 2006;44:4559-60.
- Post JJ, Pan Y, Freeman AJ, Harvey CE, White PA, Palladinetti P, et al. Clearance of hepatitis C viremia associated with cellular immunity in the absence of seroconversion in the hepatitis C incidence and transmission in prisons study cohort. *J Infect Dis.* 2004;189:1846-55.
- Semmo N, Barnes E, Taylor C, Kurtz J, Harcourt G, Smith N, et al. T-cell responses and previous exposure to hepatitis C virus in indeterminate blood donors. *Lancet.* 2005;365:327-9.
- Echevarría JM, Avellón A, Jonas G, Hausmann M, Vockel A, Kaprell HP. Sensitivity of a modified version of the ARCHITECT Anti-HCV test in detecting samples with immunoblot-confirmed, low-level antibody to hepatitis C virus. *J Clin Virol.* 2006;35:368-72.
- Maertens G, Dekeyser F, Van Geel A, Sablon E, Bosmans F, Zrein M, et al. Confirmation of HCV antibodies by the Line Immunoassay INNO-LIA™ HCV Ab III update. En: Lau JYN, editor. *Methods in molecular medicine.* Vol. 19: Hepatitis C protocols. Totowa, NJ: Humana Press; 1999. p. 11-26.
- Quiroga JA, Castillo I, Llorente S, Bartolomé J, Barril G, Carreño V. Identification of serologically silent occult hepatitis C virus infection by detecting immunoglobulin G antibody to a dominant HCV core peptide epitope. *J Hepatol.* 2009;50:256-63.
- Michalak TI, Pham TN. Anti-HCV core antibody: a potential new marker of occult and otherwise serologically silent HCV infection. *J Hepatol.* 2009;50:244-6.
- Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Barril G, Carreño V. Diagnosis of occult hepatitis C without the need for a liver biopsy. *J Med Virol.* En prensa 2010.
- Pardo M, López-Alcorocho JM, Rodríguez-Iñigo E, Castillo I, Carreño V. Comparative study between occult hepatitis C virus infection and chronic hepatitis C. *J Viral Hepatol.* 2007;14:36-40.
- Pardo M, López-Alcorocho JM, Castillo I, Rodríguez-Iñigo E, Pérez-Mota A, Carreño V. Effect of anti-viral therapy for occult hepatitis C virus infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23:1153-9.
- Barril G, Castillo I, Arenas MD, Espinosa M, García-Valdecasas J, García-Fernández N, et al. Occult hepatitis C virus infection among hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19:2288-92.
- Gudagnino V, Stroffolini T, Foca A, Caroleo B, Loiacono L, Giancotti A, et al. Hepatitis C virus infection in family setting. *Eur J Epidemiol.* 1998;14:229-32.
- Ackerman Z, Ackerman E, Paltiel O. Intrafamilial transmission of hepatitis C virus: a systematic review. *J Viral Hepatol.* 2000;7:93-103.
- Castillo I, Bartolomé J, Quiroga JA, Barril G, Carreño V. Hepatitis C virus infection in the family setting of patients with occult hepatitis C. *J Med Virol.* 2009;81:1198-203.