

Métodos de detección de las mutaciones del virus de la hepatitis B responsables de la resistencia a los antivirales orales

SANTIAGO MELÓN GARCÍA Y MARÍA DE OÑA NAVARRO

Unidad de Virología. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. Asturias. España.

Desde que hace una década se introdujeron nuevos antivirales frente al virus de la hepatitis B (VHB), el control de la infección ha mejorado notablemente. La mayoría de estos fármacos son análogos de nucleósidos/nucleótidos que actúan sobre la transcriptasa inversa del virus. Por la sencillez de la replicación viral y de la actuación de los antivirales, el virus puede rápidamente crear cepas resistentes que escapan a la actuación del fármaco. Por ello, es necesario realizar un control estrecho sobre la evolución de la población viral¹. Hoy en día este control se realiza con métodos de identificación y análisis genómico.

TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B

Hasta hace apenas 9 años, el tratamiento de la infección por el VHB se limitaba al uso del interferón (IFN), con resultados más o menos aceptables², pero los efectos secundarios y la pobre tolerabilidad del IFN limitaban la duración de la terapia.

La demostración de la actividad antiviral frente al VHB de la lamivudina supuso un gran avance en este campo, ya que definió una diana en el virus sobre la que dirigir el tratamiento (la ARN-polimerasa-ADN-dependiente o polimerasa inversa), y dejó la puerta abierta a la búsqueda de nuevos antivirales, creando así un nuevo campo de esperanza en el tratamiento para el control y la curación de la infección.

En la actualidad, 7 fármacos están disponibles para el tratamiento de la hepatitis B crónica: IFN- α , lamivudina, adefovir dipivoxil, IFN- α -2a pegilado, entecavir, telbivudina y tenofovir^{3,4}.

La satisfacción inicial con el uso de la lamivudina fue seguida de un cierto grado de decepción al comprobar que en una cuarta parte de los pacientes se constataba replicación viral después de un año de tratamiento, lo que suponía el desarrollo de resistencias en el dominio YMDD de la polimerasa, y que éstas se incrementaban hasta el 46% en el segundo año, alcanzando el 67-71% después de 4-5 años de tratamiento^{5,6}. El desarrollo de cepas resistentes es un hecho común para todos los fármacos. El adefovir, con una mayor barrera genética (peor capacidad del virus de provocar resistencias) que la lamivudina, también presenta tasas de resistencia del 0 y 3% al año y a los dos años de tratamiento, respectivamente, que se incrementaban al 29% a los 5 años⁷. Incluso los fármacos más nuevos y potentes (tenofovir y entecavir) presentan tasas de resistencia, aunque significativamente menores que los anteriores (< 1%)⁸.

Uno de los inconvenientes que pueden presentar estos fármacos es el uso de una diana común (la transcriptasa inversa viral), ya que cambios creados por un antiviral pueden influir en la efectividad de otros⁹. Por otra parte, el hecho de tener una misma diana también puede ser una ventaja en el tratamiento, ya que se pueden combinar fármacos que controlen la infección y que, en el

Puntos clave

-  El tratamiento antiviral frente al virus de la hepatitis B puede provocar resistencias a corto o largo plazo que deben ser evaluadas y controladas.
-  Los estudios genómicos (cuantificación y caracterización genómica de un fragmento diana de la retrotranscriptasa viral por secuenciación o hibridación) determinan el fallo del tratamiento.
-  Los métodos de caracterización genómica son los idóneos para el control del tratamiento en caso de fracaso y se pueden encontrar en el mercado.
-  Los estudios de secuenciación son muy específicos y permiten detectar mutaciones que pueden repercutir en un futuro tratamiento (en nuevos fármacos), pero pueden subestimar poblaciones mixtas.
-  Los estudios de hibridación son muy sensibles y permiten detectar poblaciones mixtas, pero no adelantan el resultado de actuaciones futuras. Además, deben ser actualizados periódicamente para incorporar las sondas específicas de los nuevos lugares de resistencia.

caso de que provoquen mutaciones, éstas sean tan frecuentes e importantes como para provocar la inviabilidad del virus.

CONTROL DE LA INFECCIÓN Y DE LA APARICIÓN DE RESISTENCIAS

Ante el arsenal terapéutico que se nos ofrece, todavía escaso, y la posibilidad de creación de resistencias, es imprescindible identificar eficaz y rápidamente la cepa viral infectante con el objetivo de actuar de la manera más idónea.

El primer marcador que indica el fallo del tratamiento es la cuantificación genómica. El VHB no se aísla por las técnicas habituales y la detección de antígeno e deja sin identificar a los pacientes con hepatitis crónica activa con mutaciones en dicha región. Por tanto, la cuantificación del ADN viral (determinación del número de copias o de unidades internacionales virales en sangre periférica, principalmente plasma o suero) se ha convertido en una técnica de rutina en los laboratorios de microbiología clínica como el marcador más sensible y rápido para determinar el fracaso terapéutico.

Existen diversos métodos que pueden detectar y cuantificar el genoma viral, unos basados en la amplificación genómica y otros en la amplificación de la señal (tabla 1)¹⁰. Todos estos métodos son sensibles y específicos y han mostrado buena correlación entre ellos¹¹. Hoy en día el método más comúnmente aceptado es la amplificación genómica a tiempo real (PCR-TR).

Una vez iniciado el tratamiento, se ha definido la falta de respuesta primaria como la incapacidad del antiviral de disminuir

la carga viral en más de 1 log UI/ml en los tres primeros meses de tratamiento, con respecto a la carga viral basal. Esta falta de respuesta primaria no se ha asociado a la presencia de mutaciones, pero es una indicación de cambio de tratamiento.

Sin embargo, la detección de genoma viral (el aumento de más de 1 log UI/ml o la detección de genoma viral en dos muestras en un periodo de más de un mes: “*virological breakthrough*”) después de una buena respuesta a la terapia sí se ha asociado a la presencia de mutantes que confieren resistencia. Esta situación viene acompañada de un aumento posterior de las transaminasas (“*biochemical breakthrough*”)⁸.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE RESISTENCIAS

Una vez confirmado el fracaso terapéutico mediante el aumento de la carga viral, parece imprescindible determinar la causa de dicho fracaso con técnicas más o menos accesibles hoy en día en los laboratorios de Microbiología, como son las técnicas de caracterización genómica. Ello está fundamentado en que en el VHB, como en cualquier otro virus, por la sencillez de su estructura, cualquier cambio fenotípico está determinado por un cambio genotípico.

Hoy en día, todavía no parece recomendable realizar estudios de resistencia a los pacientes antes de iniciar la terapia, salvo que hayan recibido algún tipo de antiviral efectivo para el VHB por otras causas, como los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)^{4,8}. El uso continuado y

Tabla 1. Ensayos comerciales para la detección del ADN del virus de la hepatitis B

Test o reactivo (productor)	Método	Sensibilidad analítica		Rango lineal		Referencia (s)	Regulatory status
		IU/ml	Copias/ml	IU/ml	Copias/ml		
RealTime HBV PCR (Abbott Molecular)	PCR a tiempo real	4 ^a		9-4 x 10 ⁹ ^a			Europe, CE; United States, ASR
Hybrid Capture II (Digene)	Captura de híbridos		1,9 x 10 ⁵		1,9 x 10 ⁵ - 1,7 x 10 ⁹ 3,0 x 10 ⁶ - 1,0 x 10 ⁹	107 118	United States, RUO
Ultrasensitive Hybrid Capture II (Digene)	Captura de híbridos		8 x 10 ³		8 x 10 ³ - 1,7 x 10 ⁹	107	United States, RUO
Artus HBV PCR (QIAGEN Diagnostics)	PCR a tiempo real			54 - 3,6 x 10 ⁵ 2,5 x 10 ² - 1,0 x 10 ⁹		56 135	Europe, CE; United States, no disponible
COBAS AmpliCor HBV Monitor (Roche Diagnostics)	PCR semiautomática		2 x 10 ²		2 x 10 ² - 2 x 10 ⁵ 1 x 10 ³ - 3 x 10 ⁵	69,90 118	Europe, CE; United States, RUO
COBAS TaqMan HBV (Roche Diagnostics)	PCR a tiempo real		35 ^b		1,7 x 10 ² - 8,5 x 10 ⁸ ^b	146	Europe, CE; United States, ASR, RUO (with High Pure extraction)
			12 ^c		54 - 1,1 x 10 ⁸ ^c	51	
			35 ^d		30 - 1,1 x 10 ⁸ ^d	124	
			2,5 ^e		6 - 2,1 x 10 ⁸ ^e	39	
VERSANT HBV DNA 3.0 (Siemens Medical Solutions Diagnostics)	Hibridación ramificada (bADN)		3,3 x 10 ³		3,3 x 10 ³ - 1 x 10 ⁸	156	Europe, CE; United States, RUO

^aData from company website (http://www.international.abbott.molecular.com/HBVPCRkit_1137.asp). ^bNucleid acid extraction with HighPure (Roche Diagnostics). ^cExtraction with COBAS AmpliPrep and HBV-specific chemistry (Roche Diagnostics). ^dExtraction with COBAS AmpliPrep and Total Nucleic Acid chemistry (Roche Diagnostics). ^eExtraction with MagNAPure (Roche Diagnostics).

ASR: analyte-specific reagent; CE: Conformite Europeen (approval according to European In Vitro Diagnostic Directive 98/79/EC); RUO: research use only. Tomada de Valsamakis¹⁰.

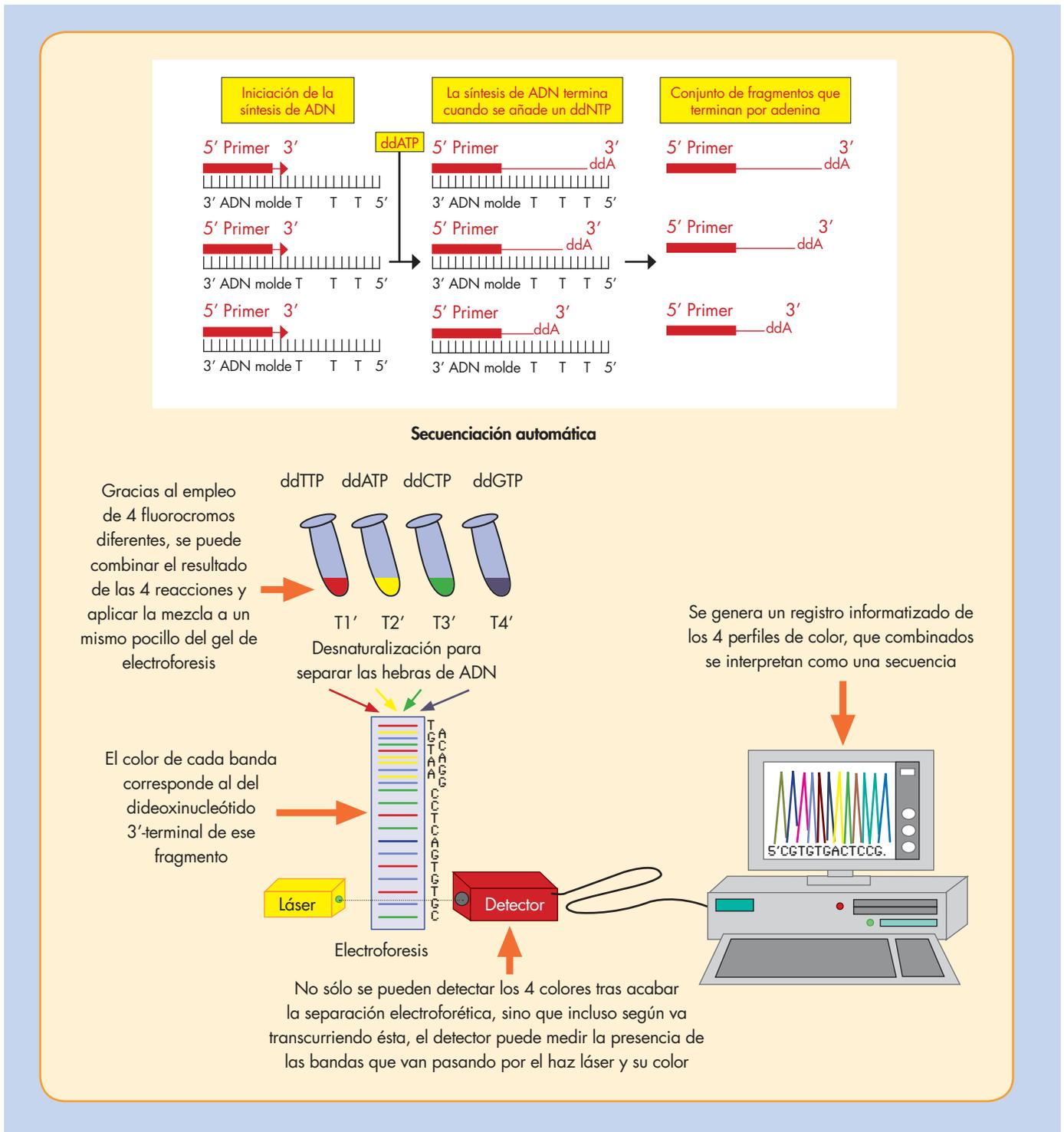


Figura 1. Método de secuenciación genómica de los dideoxinucleótidos.
Tomado de: <http://www.ucm.es/info/genetica/AVG/practicas/secuencia/Secuencia.htm>

generalizado de los antivirales y la posibilidad de transmisión de cepas resistentes no descarta esta posibilidad en un futuro próximo.

El ensayo ideal para detectar mutaciones debe ser sensible, específico, seguro, reproducible, fácil de realizar y capaz de detectar todo tipo de cambios que sugieran posibles resistencias, así como poblaciones minoritarias que porten esos cambios¹². Este tipo de ensayos se basan en el análisis, exhaustivo o no, del fragmento genómico que codifica la diana sobre la que van dirigidos los antivirales, en concreto la transcriptasa inversa viral.

Ensayos de secuenciación

El examen más completo de cualquier genoma se basa en la caracterización de dicho fragmento por métodos de secuenciación genómica, que permiten identificar los cambios que acontecen en la cadena de ADN ante la presencia de los fármacos a estudio, y que se reflejan en el fracaso terapéutico.

Los estudios de secuenciación están basados en el método de Sanger o de los dideoxinucleótidos¹³, aprovechando la técnica de amplificación genómica en un paso previo (fig. 1). Este tipo de estudios permite identificar no solo los cambios específicos y

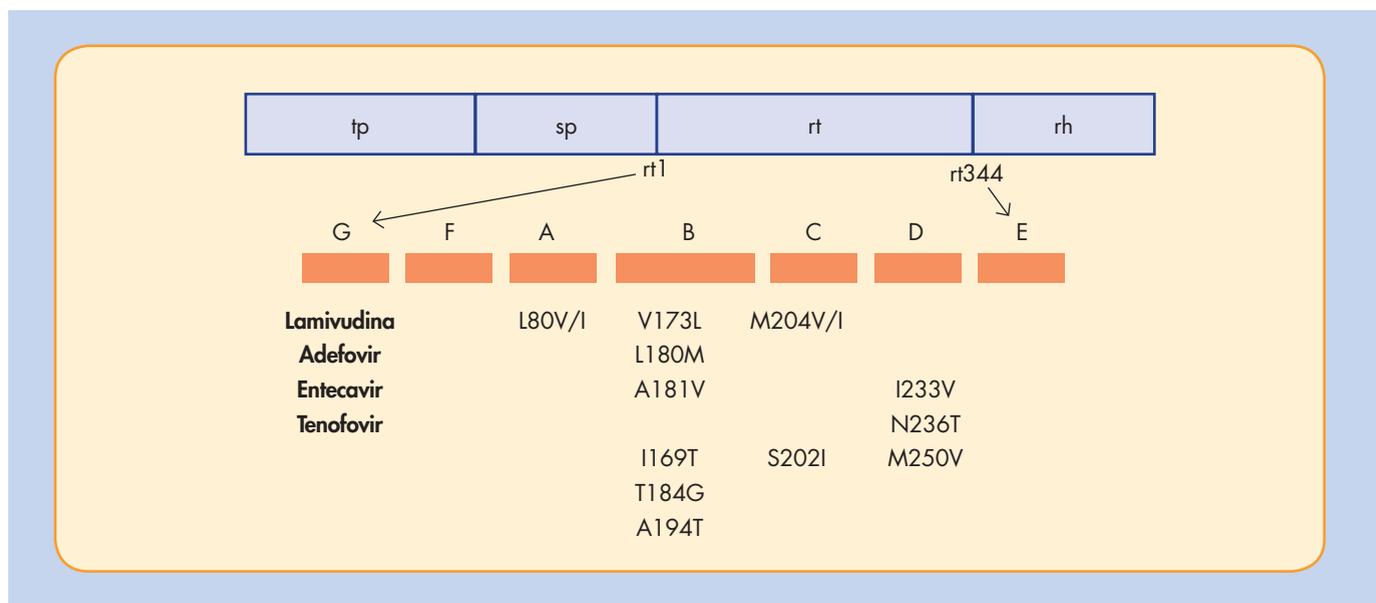


Figura 2. Esquema de la polimerasa viral del virus de la hepatitis B que muestra las posiciones de las mutaciones de resistencia más importantes descritas. Tomado de Sáez-López y Agüero-Balbín¹⁴.

directos (mutaciones primarias), sino otros cambios (mutaciones secundarias o compensatorias) que se adquieren con la persistencia del tratamiento y que ayudan a mejorar la replicación o "fitness" viral y que por sí solos no serían capaces de crear ningún nivel de resistencia. Además, permiten conocer la caracterización completa del fragmento a estudio e identificar cambios que si en un principio y en ese momento no se asocian a cambios fenotípicos importantes, pueden condicionar el comportamiento de la replicación viral en el futuro con el uso o el desarrollo de nuevos fármacos. En este sentido, es conocida la reacción cruzada entre la lamivudina y el entecavir: pacientes tratados con lamivudina fracasan primero al tratamiento con entecavir por seleccionar cepas con las mutaciones rtI169, rtM250 o rtT184 (mutaciones secundarias para la lamivudina) que confieren resistencia al entecavir. Estas mutaciones aparecen después de que un paciente haya sido tratado con lamivudina y haya seleccionado cepas resistentes con la mutación rtM204I/V, y provocan un fallo terapéutico en un tercio de los pacientes al año de tratamiento con entecavir. En los pacientes sin mutaciones la tasa de resistencia al antiviral no alcanza el 1,5% a los 4 años⁹. Además, los estudios de secuenciación permiten establecer relaciones filogenéticas entre diferentes cepas virales detectadas en el laboratorio. Estas técnicas son las utilizadas en los distintos laboratorios farmacéuticos para identificar las mutaciones asociadas a resistencia a sus fármacos (fig. 2)¹⁴.

Los métodos de secuenciación se están convirtiendo en una herramienta básica y de rutina en la práctica diaria de los laboratorios de Microbiología, y a los desarrollos propios de cada laboratorio ("caseros") ya se han sumado técnicas comerciales (TRUGENE HBV Genotyping Kit; Siemens Medical Solutions Diagnostics, USA) que hacen más asequible su uso, sin necesidad de estandarización ni desarrollo individual. Uno de los inconvenientes que se les achaca es la falta de sensibilidad para detectar poblaciones minoritarias o poblaciones mixtas: poblaciones virales con una presencia inferior al 15-20% son difíciles de identificar.

Ensayos de hibridación

Otros métodos más sencillos en su elaboración y en su adaptación a los laboratorios clínicos son los basados en técnicas de hibridación con sondas específicas según los protocolos ya descritos por Southern en 1975¹⁵, y en los que se han desarrollado diversas modalidades: amplificación e hibridación con sondas enzimáticas, amplificación e hibridación en *microarrays* con sondas enzimáticas o fluorescentes, o PCR-TR¹².

En todos ellos el principio es el mismo: diseñar sondas (oligonucleótidos de 20-30 pares de bases) similares al fragmento salvaje y otras sondas que porten la mutación que se pretende detectar y que confiere resistencia. Para llevar a cabo la prueba se deben diseñar tantas sondas como mutaciones a identificar (fig. 3). Todas ellas se benefician de una amplificación genómica previa para conseguir la mayor cantidad de copias del virus y lo único que cambia en estos sistemas es el revelado de dicha hibridación¹².

El INNO-LiPA DR versión 2.0 (Innogenetics, Bélgica) utiliza sondas enzimáticas unidas a una membrana de nitrocelulosa. Es sencillo y automático pero presenta problemas de interpretación y de resultados inespecíficos.

Los *microarrays* se basan también en una amplificación genómica y en una posterior hibridación con sondas salvajes y mutantes para cada posición de resistencia. Su reducido tamaño permite detectar una gran cantidad de mutaciones en un solo proceso, y el uso de sondas fluorescentes aumenta la sensibilidad para detectar poblaciones minoritarias, pero siguen padeciendo el problema de los resultados inespecíficos (fig. 4).

Por último, la PCR-TR aumenta la rapidez al provocar la hibridación a la vez que la amplificación, pero limita la cantidad de sondas a utilizar ya que el sistema sólo permite detectar 6 fluoróforos distintos.

Estos métodos basados en hibridación parecen más adecuados que los métodos de secuenciación para detectar poblaciones minoritarias y poblaciones mixtas, ya que la unión de la sonda específica va a permitir la visualización de una señal indepen-

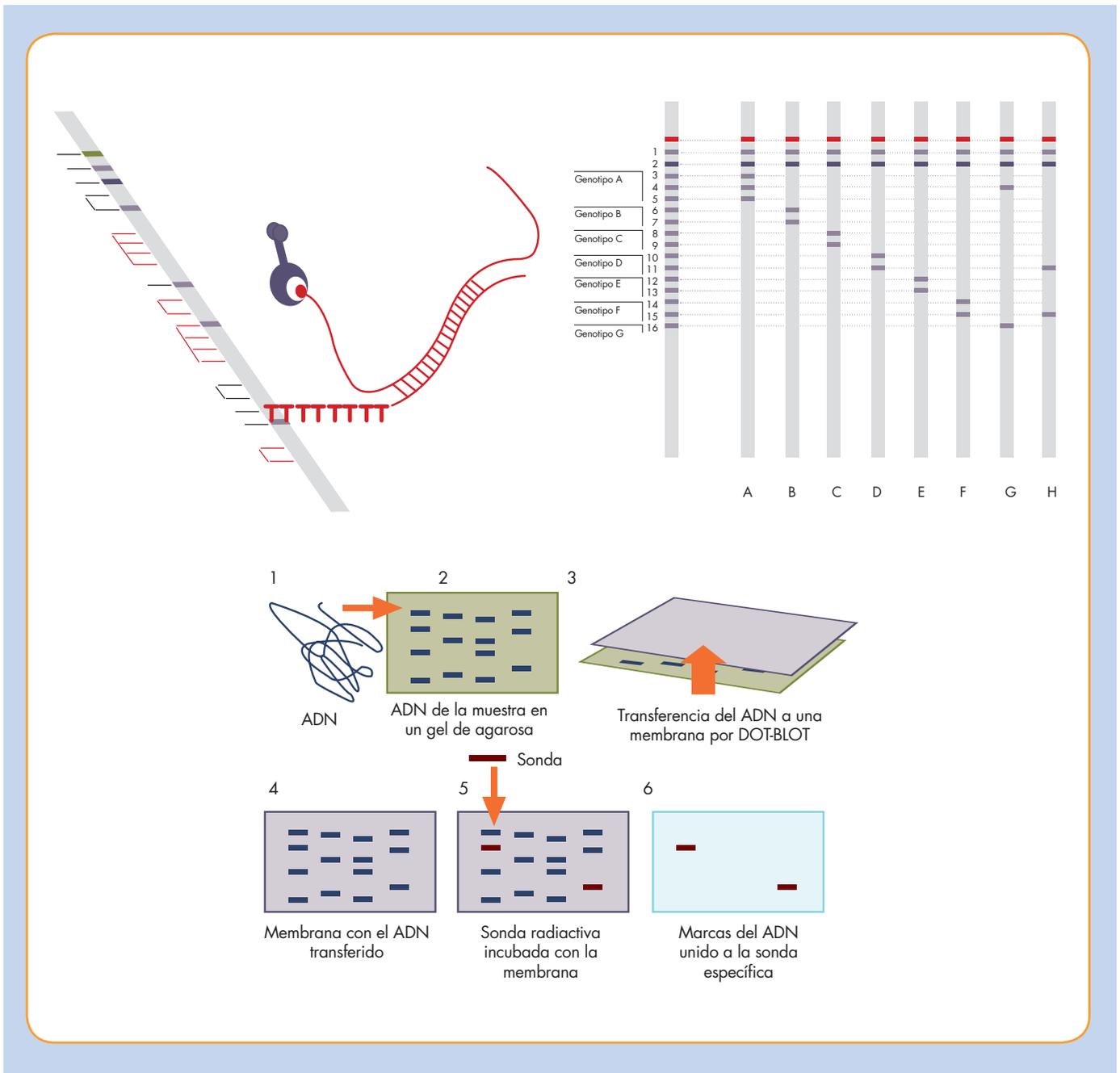


Figura 3. Técnica de hibridación de sondas enzimáticas (INNO-Lipa) basada en el método de Southern.

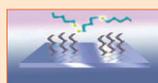
dientemente de la cantidad en que se encuentren presentes las distintas poblaciones virales, lo que también parece anticipar la presencia de cepas resistentes. Sin embargo, las comparaciones de ambas técnicas en un mismo proceso todavía no son concluyentes. Además, dado que ambos métodos se basan en la amplificación genómica para aumentar la sensibilidad, la selección de cepas mayoritarias es un inconveniente para ambas. Así pues, los porcentajes de detección de cepas minoritarias aceptados del 5% para la hibridación y del 20% para la secuenciación no son del todo reales: la secuenciación podría bajar a porcentajes del 10-15% o menos. Por otra parte, los métodos de hibridación deben ser revisados periódicamente para introducir las sondas que detecten las nuevas mutaciones que confieren resistencia.

CONCLUSIONES

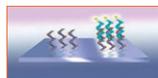
La aparición de diversos antivirales frente al VHB ha provocado el desarrollo de técnicas de detección de resistencias basadas en la caracterización genómica. Aunque diversos trabajos pueden abogar por un método de secuenciación o de hibridación, en la actualidad el uso de uno u otro depende más de la infraestructura, los conocimientos y la rutina del laboratorio que de las ventajas o desventajas de cada método. En cualquier caso, hoy en día este tipo de tecnología es accesible a cualquier profesional para la ayuda en el tratamiento de la infección crónica por el VHB.



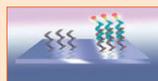
El *microarray* es un vidrio recubierto de una sustancia polimérica sobre el que se depositan 120 *spots* o puntos de hibridación compuestos de cadenas de ADN monohebra. Cada punto posee sondas específicas que hibridan con las secuencias buscadas en el ADN de la muestra.



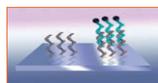
El ADN de la muestra, amplificado previamente y marcado con biotina, se añade sobre el *microarray*



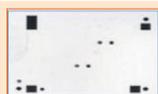
El ADN marcado con biotina se une específicamente a sus sondas complementarias sobre el *microarray*



Se añade estreptavidina-peroxidasa, que se une a las moléculas de biotina con las que se marcó el ADN de la muestra



En presencia del sustrato o-dianisidina se induce la precipitación de un compuesto insoluble sobre las zonas donde se produjo la hibridación del ADN



Una imagen final del *microarray*



Tubo donde se lleva a cabo el ensayo



Imagen de un *microarray* con sondas fluorescentes

Figura 4. Esquema del método de microarrays. Tomada de: <http://www.genomica.es>

BIBLIOGRAFÍA



● Importante ●● Muy importante

- Marcellin P. Hepatitis B and hepatitis C in 2009. *Liver Int.* 2009;29 Suppl 1:1-8.
- Moucari R, Korevaar A, Lada O, Martinot-Peignoux M, Boyer N, Mackiewicz V, et al. High rates of HBsAg seroconversion in HBsAg-positive chronic hepatitis B patients responding to interferon: a long-term follow-up study. *J Hepatol.* 2009;50:1084-92.
- Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ, Fleischer R, Lok AS. Management of hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology.* 2007;45:1056-75.
- EASL clinical practice guidelines management of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2009;50:227-42.
- Liaw YF, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, et al. Effects of extended lamivudine therapy in Asian patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2000;119:172-80.
- Zoulin F, Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. *J Hepatol.* 2008;48 Suppl 1:S2-19.
- Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, et al. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology.* 2006;131:1743-51.
- Ghany MG, Doo EC. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology.* 2009;49 5 Suppl:S174-84.
- Sherman M, Yurdayin C, Sollano J, Silva M, Liaw YF, Cianciara J, et al. Entecavir for treatment of lamivudine-refractory, HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology.* 2006;130:2039-49.
- Valsamakis A. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic hepatitis B. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:426-39.
- Laperche S, Thibault F, Bouchardeau F, Alain S, Castelain S, Gassin M, et al. Expertise of laboratories in viral load quantification, genotyping and precore mutant determination for hepatitis B virus in a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3600-7.
- Yeon J. Technique for the early detection of drug-resistant HBV DNA during antiviral therapy. *Intervirology.* 2008;51 Suppl 1:7-10.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1977;74:5463-7.
- Sáez-López A, Agüero-Balbín J. Resistencias a los antivirales en los virus de las hepatitis B y C. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2006;24:576-84.
- Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975;98:503-17.