



Detección cuantitativa del DNA del virus de Hepatitis B

15 min.



La infección por el virus de Hepatitis B (HBV) afecta muchos millones de personas en todo el mundo y la hepatitis viral asociada es considerada un problema de salud pública mayor en muchas áreas. El Dr. Daniel Pirola nos muestra en este artículo los métodos de cuantificación, aplicaciones, pronóstico y tratamiento de estos casos.



Dr. Daniel A. Pirola
Jefe de Virología de MANLAB



E-mail: virologia@emanlab.com.ar



La infección por el virus de Hepatitis B (HBV) afecta muchos millones de personas en todo el mundo y la hepatitis viral asociada es considerada un problema de

salud pública mayor en muchas áreas. La OMS ha estimado que actualmente 360 millones de personas están crónicamente infectadas por el virus y el virus ocasiona el 30 % de los casos de cirrosis y el 50 % de los casos de hepatocarcinoma.

En los últimos años, un conjunto de nuevas metodologías se han desarrollado para su diagnóstico, y como herramienta útil en su tratamiento, evolucionando desde la simple detección del HBsAg hasta la cuantificación y caracterización del genoma viral. En este aspecto, los métodos que usan estrategias basadas en la biología molecular son actualmente aplicados para analizar las donaciones de sangre, diagnosticar infección activa, como ayuda en establecer el pronóstico, orientar el tratamiento y para verificar la respuesta al mismo.

Los genomas virales están presentes en cantidades relativamente pequeñas en los líquidos biológicos del organismo por los que, en general, se requiere de metodologías que amplifiquen significativamente su detección. Basadas en estos principios se han desarrollado básicamente

dos grandes grupos de ensayos, (a) aquellos que amplifican el DNA viral y (b) aquellos que amplifican la señal de detección.

Los métodos pertenecientes a la categoría en el punto a, incluyen a la ya tan conocida técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con diferentes variantes metodológicas. Recientemente, una variedad conocida como PCR en tiempo real se ha impuesto por sus ventajas de sensibilidad, rapidez y extensión de su rango dinámico de detección. Otras metodologías de amplificación de la señal descriptas incluyen al NASBA y al TMA (amplificación mediada por transcripción) ambas de uso clínico actualmente.

El método basado en el principio del punto b se conoce como método de branched DNA (bDNA).

Métodos de cuantificación

La Figura 1 muestra los ensayos comerciales disponibles localmente para cuantificar HBV DNA incluyendo los rangos dinámicos determinados por los fabrican-

MANLAB®

Suscríbete a Revista Bioanálisis

Ingrese a la selecta red de profesionales del diagnóstico, investigadores, bioquímicos, médicos, académicos, estudiantes, dirigentes y empresarios que leen *Revista Bioanálisis*.

Revista Bioanálisis le ofrece, cada 2 meses, información confiable sobre todos los temas de su interés profesional.

Suscripción Anual
por sólo

*Suscripción anual, 6 ejemplares

\$ 120*

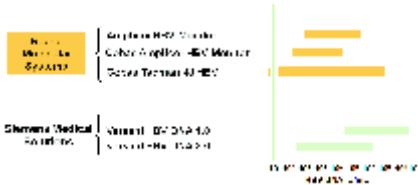
Podrá suscribirse a través de nuestra página web: www.revistabioanalisis.com



tes. Este rango puede extenderse por dilución previa de la muestra. Estos ensayos son específicos y exactos dentro del rango dinámico.



Fig. 1 Ensayos para HBV DNA disponibles localmente: Rangos Dinámicos



La influencia del genotipo en la determinación de la concentración de virus en plasma, también denominada carga viral (CV), no ha sido extensamente evaluada pero está descripta para el genotipo F y ensayos de PCR. Lo mismo que para otros virus, se recomienda no considerar variaciones en la CV menores a $0.5 \log_{10}$ como analíticamente significativas.

Varios años atrás los ensayos para cuantificar HBVDNA expresaban los resultados en copias/mL o pg/mL de HBVDNA llevando a notorias diferencias intermétodos. Recientemente, la OMS estableció un estándar universal para unificar la expresión de los resultados definiendo la Unidad Internacional y es especialmente útil en los ensayos desarrollados recientemente que poseen una muy alta sensibilidad (entre 50 y 100 UI/mL). Este estándar está basado en el genotipo A y la Unidad Internacional es equivalente a aproximadamente 5.4 equivalentes de genoma o copias virales. Aún así es posible encontrar para una misma muestra variaciones entre los resultados obtenidos por metodologías estandarizadas por lo que se recomienda el seguimiento comparativo de resultados de un paciente por la misma metodología.

Aplicaciones

Algunas de las aplicaciones de la cuantificación de la carga viral se encuentran en la figura 2.

Bancos de sangre: Los ensayos de carga viral no se realizan universalmente en el Banco de Sangre aunque numerosos estudios realizados demuestran que la detección del HBVDNA es aproximadamente 21 días anterior a la aparición del HBsAg en la detección de la infección reciente. Aún cuando se deseé disminuir el riesgo de transmisión de HBV la detección cualitativa sería suficiente.



Fig. 2 Cuantificación del HBV DNA Carga Viral

- Indicador de la actividad de replicación
- Cuantificar la eficacia del tratamiento antiviral
- La cinética de la Carga Viral puede predecir el resultado de la respuesta al tratamiento
- Detección temprana de resistencia viral
- Detección de infección oculta por HBV

Diagnóstico de la infección por HBV: Los ensayos serológicos son normalmente suficientes para el diagnóstico de la infección aguda por HBV. La infección crónica se define como la persistencia del HBsAg en suero por más de 6 meses.

En esas circunstancias la cuantificación de HBVDNA es necesaria para determinar el grado de replicación viral y correlacionarlo con la presencia o ausencia de HBeAg, con las alteraciones bioquímicas e histológicas y la actividad de fibrosis.

En presencia de HBeAg el diagnóstico de infección crónica replicativa puede realizarse independientemente del nivel de CV. En los casos de HBeAg negativos o anti-HBe positivos (situación que se asocia a la presencia de virus con mutaciones en la región pre core del genoma viral) la CV viral es el único marcador de replicación. La diferenciación entre estos pacientes y los portadores inactivos es difícil, pues se pueden observar en ambos casos muy bajos niveles de CV.

Con los nuevos métodos que pueden detectar CV muy pequeñas se hizo

necesario definir niveles significativos de replicación, es aceptado que CV inferiores a 100 UI/mL se asocian a portadores inactivos mientras que concentraciones mayores deben asociarse a replicación viral activa.

Severidad y Pronóstico

Si bien el examen histológico del hígado es la mejor forma de evaluar la severidad de la hepatitis crónica por HBV la detección de HBVDNA aporta una valiosa información pronóstica. En hepatitis crónica B (CHB) niveles elevados de HBV DNA se asocian con un riesgo aumentado de progresión de esta a formas más severas como cirrosis o hepatocarcinoma. Este riesgo es bajo si la hepatitis crónica está asociada a bajas CV pero esta conclusión carece de valor cuando la consideramos en casos de cirrosis.

Tratamiento

La CV de HBVDNA es de vital importancia en el tratamiento de la infección por HBV tanto como en la decisión del tratamiento, selección de la terapéutica óptima, control de la efectividad y seguimiento de la aparición de mutaciones de resistencia a los antivirales análogos de nucleótidos o nucléosidos. En la figura 3 se describen los parámetros habituales para evaluar una respuesta al tratamiento.



Fig. 3 Como se define la respuesta a antivirales

Viroológica

- Completa: niveles indetectables de HBV DNA ($< 60 \text{ IU/mL}$)
- Parcial: disminución de HBV DNA de al menos 2 logs y a menos de $20,000 \text{ IU/mL}$
- Falla de respuesta primaria: disminución de HBV DNA $< 2 \text{ logs}$.

Serológica

- HBeAg seroconversión: pérdida de HBeAg y aparición de anti-HBe
- HBsAg seroconversión: pérdida de HBsAg y aparición de anti-HBs

a.- En la decisión de iniciar tratamiento se

MEDICINA GENÓMICA

Contamos con un perfil integral que incluye los análisis referidos a los avances en genética:

Cánceres Hereditarios

- Cáncer hereditario de mama y/u ovario (Genes BRCA 1 y BRCA 2)
- Detección de p53 (exones 4-5-6-7-8-9)
- HER2/NEU
- K-Ras

Citogenética

- Cariotipo de Alta Resolución
- Cariotipo en material de aborto espontáneo
- Citogenética clásica
- Citogenético prenatal en Vellosidades Coriónicas - Cultivo
- Citogenético prenatal en Vellosidades Coriónicas - Directo
- Cr22Q11

Enfermedades Cardiovasculares

- Apo E (Estudio de alelos asociados a riesgo vascular)
- ECA (Enzima convertidora de angiotensina)
- Genotipo CYP2C9 (Hipersensibilidad a la Warfarina)

Enfermedades Hereditarias

- Alzheimer (variantes alélicas de Apo E)
- Ataxia de Friedreich
- Ataxia espinocerebelosa tipo 1 (SCA-1)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 2 (SCA-2)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 3 (SCA-3)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 6 (SCA-6)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 7 (SCA-7)
- Ataxia espinocerebelosa tipo 8 (SCA-8)
- Atrofia espinal bulbar (Enfermedad de Kennedy)
- Atrofia muscular espinal tipo I (SMA I)
- Charcot Marie-Tooth IA
- Corea de Huntington
- Distonía de torsión temprana (DYT 1)
- Distrofia miotónica de Steinér
- Distrofia óculo faríngea
- Duchenne, distrofia muscular (9 delecciones)
- Fibrosis Quística (Mutación Delta F508)
- Fibrosis Quística (Otras Mutaciones)
- Fragilidad del cromosoma X
- Fragilidad del cromosoma X en Diag. Prenatal
- Neuropatía tomaculosa(HNPP)
- Poliquistosis renal (PKD I y/o PKD II).
- Estudio de ligamiento Fliar.
- Prader Willi(paciente-padre-madre) Microsatélites
- Prader Willi-metilación (presencia de la mutación)
- Síndrome de Angelman (paciente-padre-madre)Microsatélites
- Síndrome de Angelman-metilación (presencia de la mutación)
- Sordera hereditaria (Mutación 35delG en el gen de la conexina 26)

Enfermedades Metabólicas

- Galactosemias
- Enfermedad de Gaucher
- MELAS(secuenciación del transfer de leucina)
- Enfermedad de Canavan
- Enfermedad de Tay-Sachs
- MERRF (A834G en ARNt lisina)
- NARP (T8993G en ADN mitocondrial)
- Panel Askenazi (caso índice)
- Panel Askenazi (cada Fliar.)

Esterilidad

- AZF(Estudio de 9 microdelecciones en el cromosoma Yg11)
- SRY(Detección del gen SRY)
- Determinación de la variante 5AT en el gen de la fibrosis quística

Estudios de Filiación e Identidad

- Filiación (padre alegado-hijo)
- Filiación (padre alegado-hijo-madre)
- Tipificación de ADN (DNA Typing)

Infectología

- Adenovirus (genoma)
- Bordetella pertussis (genoma)
- Chlamydia trachomatis(genoma)
- Citomegalovirus (CMV) (genoma)
- Citomegalovirus (CMV) Carga Viral
- Coxsackie virus (genoma)
- Echovirus (genoma)
- Enterovirus (EV) (genoma)
- Epstein - Barr (EBV) (genoma)
- Epstein Barr Carga Viral
- Hepatitis B (HBV) (genoma)
- Hepatitis B (HBV) (carga viral)
- Hepatitis B(HBV) (genotipificación)
- Hepatitis C (HCV)(carga viral)
- Hepatitis C (HCV)(genoma)
- Hepatitis C (HCV)(genotipificación)
- Herpes 6 (genoma)
- Herpes simplex I y II (HSV I y II) (genoma)
- HIV (DNA Proviral)
- HIV (carga viral)
- HIV (genoma)
- HIV (Resistencia a antirretrovirales)
- HTLV I y II (genoma)
- Mycobacterium tuberculosis (genoma)
- Mycoplasma pneumoniae (genoma)

- Papilomavirus (HPV) (tipificación subtipos 16 y 18)
- Parvovirus (genoma)
- Pneumocystis carinii (genoma)
- Toxoplasma gondii (genoma)
- Trypanosoma cruzi (genoma)
- Varicela zoster (VZV)(genoma)
- Virus JC (genoma)

Inmunología y Transplante

- Cross Match contra donante
- Cross Match frente a panel
- HLA 29
- HLA ABC
- HLA B27
- HLA DQ
- HLA DR
- Quimerismo (estudio pre y post trasplante)

Neoplasias Hematológicas

- Beta Talasemia
- Citogenética clásica en leucemias
- Delecciones de Tal 1 (del gen Tal/SIL-TAL 1)
- Factor II de Protrombina (Mutación G20210)
- Factor V de Leiden
- Hemocromatosis (Mutación C282Y)
- Hemocromatosis (Mutación H 63 D)
- Inmunofenotipo en leucemias
- Inversión i(16)/CBFB-MYN II
- Jak 2
- MTHFR
- PAI (polimorfismo 4G/5G en PAI-1)
- Rearreglo del Gen del receptor de Células T/ TCR-y
- Traslocación Bcl-1/ t (11;14)
- Traslocación Bcl-2/IgH t (14;18)
- Traslocación BCR-ABL t (9;22) Cuantificación
- Traslocación BCR-ABL t (9;22) Detección de p190/ p210
- Traslocación PML-RAR alfa t (15-17)
- Traslocación t (1,19)
- Traslocación t (8,14)
- Traslocación t (8,21), (M2)/AML1-ETO
- Traslocación t (12,21)/ TEL-AML1
- Traslocación t (2,5) ALK
- Traslocación t (4,11)

consideran individualmente factores como los niveles aumentados de ALT (alanina amino transferasa), cambios histológicos indicadores de hepatitis crónica con o sin cirrosis y la presencia de niveles aumentados de HBV DNA, Figura 4.



Fig. 4. Quienes deben recibir tratamiento



Los criterios actuales indican el tratamiento en ambos casos de CHB HBeAg positivo o negativo si la concentración de HBV DNA $> 20,000$ IU/mL y ALT $> 2 \times$ el valor máximo normal.

Las drogas usadas en el tratamiento de CHB son incluyen:

- Lamivudine
- Adefovir
- Entecavir
- Peginterferon alfa-2a
- Telbivudine
- Tenofovir
- Interferon alfa-2b

b.- Cuando se selecciona el tratamiento óptimo se ha verificado que muchos pacientes con CV baja responden más efectivamente al tratamiento con IFN que aquellos con alta CV. Los pacientes no respondedores al IFN no evidencian cambios en la CV o presentan cambios poco significativos. Para los análogos de nucleótidos no se observan diferencias.

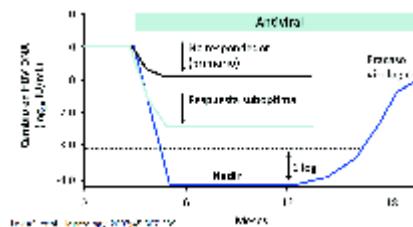
c.- Para el monitoreo de la respuesta antiviral la cuantificación de la CV, la disminución de ALT y las determinaciones de la seroconversión de HBeAg a anti-HBe en pacientes previamente HBeAg positivos son los parámetros críticos para la evaluación. La CV basal pretratamiento es entonces importante para luego verificar la

respuesta y la emergencia de resistencia particularmente al lamivudine o los análogos de nueva generación (adefovir, tenofovir y entecavir).

La CV es un importante parámetro durante el tratamiento y la mayoría de las guías clínicas proponen como objetivo final de éxito la supresión de la replicación viral, figura 5. La evaluación de la respuesta bioquímica y virológica se realiza a la 12, 24 y 48 semanas. Se considera una respuesta virológica cuando el HBVDNA es < 60 UI/mL y una respuesta bioquímica cuando ALT es 40 UI/L.



Fig. 5 Respuesta al tratamiento antiviral



En pacientes que reciben análogos de nucleótidos o nucleósidos, por ejemplo lamivudine como droga prototípico, la potente actividad antiviral se evidencia con una rápida y significativa caída en la CV. Los niveles disminuyen a valores bajos o indetectables al cabo de pocas semanas de tratamiento si responde en forma completa.

En no todos los casos la respuesta es total. La figura 6 indica la evaluación a realizar en aquellos casos de pacientes inicialmente no respondedores.

Los objetivos parciales de tratamiento pueden sintetizarse en lograr HBVDNA $< 20,000$ IU/mL, pérdida del HBeAg, pérdida del HBsAg o de ambos, HBVDNA indetectable por método de alta sensibilidad, normalización de ALT, seroconversión del HBeAg y del HBsAg posteriormente.

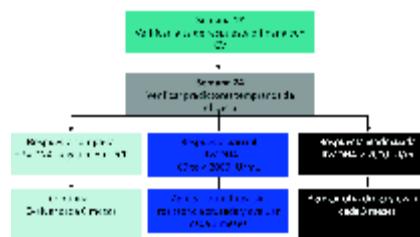
Pequeñas cantidades de HBVDNA pueden detectarse luego de la serocon-

versión de HBeAg cuando se utilizan metodologías de alta sensibilidad en tanto estos niveles bajos tienden a desaparecer cuando se produce la seroconversión del HBsAg a anti HBsAg.

d.- Como predictor de la respuesta la detección de HBVDNA a la semana 4 con un nivel < 2000 IU/mL indica probablemente una buena respuesta. Si a la semana 12 la disminución de la CV es $< 1 \log_{10}$ seguramente se trata de una falta de respuesta primaria y se deberá cambiar o agregar otra droga antiviral. En la semana 24 la presencia de HBV detectable es indicador de la necesidad de una segunda droga.



Fig. 6 Respuestas subóptimas en la Hepatitis Crónica B



e.- Como indicador de la necesidad de terapia combinada si el HBV DNA es detectable en concentración mayor de 1000 UI/mL después de 12 meses de tratamiento con monoterapia con Adefovir o Entecavir o después de 6 meses de tratamiento con lamivudine.



Fig. 7 Manifestaciones de la resistencia antiviral



f.- Cuando el virus es resistente a

lamivudine, situación que se evidencia en aproximadamente el 20 % de los pacientes al cabo de un año de tratamiento y que sube al 40 % luego de dos años, la CV aumenta pero a niveles generalmente menores a los del inicio del tratamiento (Figura 7). La resistencia se explica debido a la selección de mutantes de resistencia que emergen como consecuencia de mutaciones puntuales únicas o múltiples en zonas internas o cercanas al dominio de polimerasa de la enzima. Estas mutaciones pueden sospecharse en los casos de aumentos de la CV intratratamiento. El criterio habitual es un aumento en el HBV DNA > 1.0 log IU/mL. Con mayor exactitud la resistencia puede determinarse por identificación genética de mutaciones asociadas a resistencia a drogas utilizando secuenciación directa o hibridación reversa del gen de la polimerasa viral. Estas mutaciones para resistencia primaria son rtM204I y para resistencia secundaria "rtL180M with rtM204V". Otros indicadores de resistencia son aumento en los niveles de ALT y un deterioro clínico no explicados por otras causas.

g.- En los pacientes HBe Ag Negativos con CHB la carga viral es el único marcador virológico que puede guiar la interrupción del tratamiento, sin embargo en la mayoría de las guías de tratamiento no se recomienda en la práctica la interrupción debido al alto porcentaje de pacientes en las cuales la replicación se reinicia luego de suspendido el tratamiento.

h.- La carga viral también es de utilidad en la etapa post tratamiento para monitorear la reaparición de replicación viral una vez suspendido el mismo. Los intervalos de detección varían entre 1 a 3 meses durante el primer año y luego cada 6 a 12 meses.

Entre los nuevos desafíos para los próximos años podemos mencionar la mayor estandarización en la cuantificación, la definición de mejores y más precisos puntos de corte en las aplicaciones clínicas que puedan utilizarse como recomendaciones para el tratamiento.



Bibliografía:

- 1.- Baumert TF, Thimme R, von Weizsäcker F. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2007;13(1): 82-90.
- 2.- Pawlotsky JM. Virologic techniques for the diagnosis and monitoring of hepatitis B. *Gastroenterol Clin Biol*. 2008 Jan;32(1 Pt 2):S56-63.
- 3.- Pawlotsky JM, Dusheiko G, Hatzakis A, Lau D, Lau G, Liang TJ, Locarnini S, Martin P, Richman DD, Zoulim F. Virologic monitoring of hepatitis B virus therapy in clinical trials and practice: recommendations for a standardized approach. *Gastroenterology*. 2008 Feb;134(2):405-15.
- 4.- Alexandra Valsamakis. Molecular Testing in the Diagnosis and Management of Chronic Hepatitis B. *Clin Micro Rev*, July 2007, p. 426-439.

EVOLUCIÓN Y CRECIMIENTO

en autoinmunidad y alergia

AUTOINMUNIDAD ELISA

ANA-Detect (26 Antigenos). Orgentec
 ENA Screening (6 Antigenos). Immuno Concepts
 ENA Screen (6 Antigenos). Orgentec
 ENA Multiparamétrico. Immuno Concepts
 ENA Combi. Orgentec
 ENA Profile (4 Antigenos). Orgentec
 ENA Profile (6 Antigenos). Orgentec
 Anti SS-A; SS-B; Sm; RNP/Sm; Scl70; Jo-1. Orgentec
 Anti RNP 70Kd. Orgentec
 Anti MCV (anti Vimentina Citrulinada Mutada). Orgentec
 Cardiolipina IgG & IgM. (1 cut-off). Immuno Concepts
 Cardiolipina Screening. Immuno Concepts
 Cardiolipina IgG & IgM. (6 calibradores). Orgentec
 β2 Glicoproteína I IgG & IgM. Orgentec
 Gliadina IgA. Radim
 Gliadina IgG. Radim
 Transglutaminasa IgA. Radim
 Transglutaminasa IgG. Radim
 Anti Tissue Transglutaminase IgA. Orgentec
 Anti Tissue Transglutaminase IgG. Orgentec

AUTOINMUNIDAD IFA

HEP-2. Immuno Concepts
 HEP-2. Orgentec
 HEP-2000. Immuno Concepts
 nDNA (Crithidia luciliae). Immuno Concepts
 nDNA (Crithidia luciliae). Orgentec
 ANCA Etanol. Immuno Concepts
 ANCA Formol. Immuno Concepts
 Anti-Endomysium Antibodies (AEA) Monkey esophagus. Orgentec
 Rat Liver / Kidney / Stomach. Orgentec
 Rat Liver / Kidney (with Medulla) / Stomach. Orgentec
 Rat Stomach. Orgentec
 Rat Kidney. Orgentec
 Rat Kidney / Stomach. Orgentec
 Rat Liver. Orgentec

AUTOINMUNIDAD INMUNOBLOTE

ANA- 9 Line (9 Antigenos). Orgentec
 Gastro 5 Line (Gliadina, Transglutaminasa, Factor intrínseco, antígeno Células parietales, ASCA). Orgentec
 ANCA-3-Line (PR3, MPO, GBM). Orgentec

ALERGIA ELISA

IgE total. Radim
 IgE específica. Radim
 Más de 400 alergenos biotinilados. Radim



(011) 4771-3783/4771-7676
www.bioars.com.ar

