

INFECCIÓN OCULTA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B (VHB)

Dra. Cristina del Rosario Gutiérrez García, MSc.

Laboratorio de Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (I.V.I.C.)

RESUMEN

La infección oculta por el virus de hepatitis B (VHB) se caracteriza por la presencia de actividad de replicación viral en ausencia de marcadores serológicos usuales: las infecciones residuales se producen en ausencia del antígeno de superficie del VHB (AgHBs) y en presencia de anticuerpos anti-HBc y las infecciones "silentes" se caracterizan por la ausencia de marcadores serológicos de la hepatitis B. La presencia de variantes virales del VHB pudieran ser la causa de la baja actividad de replicación viral y por ende del desarrollo de estas infecciones ocultas. El diagnóstico de hepatitis en tales individuos se hace difícil, dado que los marcadores virales tanto en suero como en hígado, con frecuencia se encuentran por debajo del límite de detección de los inmunoensayos corrientemente utilizados. Se ha sugerido que el uso de técnicas altamente sensibles de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) pudiera ser útil en la determinación de estas infecciones. El estudio sobre los mecanismos de generación de las infecciones ocultas contribuye a una mejor comprensión sobre la realidad epidemiológica de la hepatitis B.

PALABRAS CLAVE: VIRUS, HEPATITIS B, REPLICACIÓN, VARIANTES, INFECCIÓN RESIDUAL, INFECCIÓN SILENTE, DONANTES, TRANSFUSIONES.

SUMMARY

Hepatitis B virus (HBV) occult infection is characterized by viral replication in the absence of the usual serological markers: residual infections are defined by the presence of anti-HBcAg antibodies without HBsAg and "silent" infections are characterized for the absence of all HBV serological markers. Viral variants of HBV might be responsible for a low replication activity and then for the development of these occult infections, which might be a mechanism of persistence for this virus in the host. The diagnosis of hepatitis in such patients is difficult because the viral markers in serum and liver are frequently present under the detection limit of immunoassays currently used. The development of nucleic acid amplification technologies (NAT) might be useful to detect these infections. The study of the mechanisms of generation of occult infections contributes to a better understanding of HBV epidemiology.

WORDS KEY: HEPATITIS B VIRUS, REPLICATION, VARIANTS, RESIDUAL INFECTION, SILENT INFECTION, NAT, DONORS, TRANSFUSIONS.

Act Cient de la Soc Venez de Bioanal Espec 2000; 6 (1-2): 29-38

Aceptado para su publicación julio de 2000

INTRODUCCIÓN

El VHB es uno de los virus más importantes desde el punto de vista clínico ya que existen aproximadamente 350 millones de portadores de este agente viral. En Venezuela la endemicidad de infección por VHB es baja con tendencia a intermedia, afectando a un 1-1,5% de la población venezolana, en la cual la mayor parte pertenece al grupo de bajo riesgo, como es el caso de los donantes de sangre.

En los últimos años se ha demostrado que la infección por VHB puede resultar en bajos niveles de transcripción genética viral^{1,2}, lo cual es uno de los posibles mecanismos de persistencia del virus en el hospedero³. El diagnóstico de la infección por VHB en tales individuos se hace difícil, dado que los marcadores virales tanto en suero como en hígado, con frecuencia se encuentran por debajo del límite de detección de los inmunoensayos corrientemente utilizados. Se han descrito infecciones ocultas producidas por el VHB, crónicas y asintomáticas, las cuales cursan con patrones serológicos inusuales asociados a baja carga de ADN genómico y persistencia viral⁴. Tal es el caso de las infecciones residuales producidas en ausencia del AgsHB y en presencia de anticuerpos anti-HBc⁵ y de las infecciones "silentes", caracterizadas por la ausencia de marcadores serológicos del VHB⁶. A continuación se tratarán algunos aspectos sobre la biología y curso de la infección producida por VHB así como las causas y posibles mecanismos de origen de estas infecciones crónicas de hepatitis B con patrones serológicos atípicos.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

Biología molecular y estructura viral

El VHB constituye el agente prototipo de una familia de virus ADN designada *Hepadnaviridae* (Figura 1A). El virión infeccioso del VHB se observa al microscopio electrónico como una partícula esférica de aproximadamente 42 nm de

diámetro. Llamada originalmente partícula de "Dane", consiste en una partícula compleja de doble envoltura, en la cual se distingue una cápside de 27 nm rodeada de una envoltura lipoproteica de 7 a 8 nm de espesor. Este virión completo tiene una densidad de 1.28 g/cm³ en CsCl. Su nucleocápside contiene la proteína de la cápside con la especificidad del antígeno de la cápside (AgcHB), cuya forma no particulada denominada antígeno e (AgeHB) es secretada en el suero durante la infección viral. Igualmente, la nucleocápside del virión encierra una molécula pequeña (3200pb) circular de ADN de doble cadena parcial y actividad endógena de ADN polimerasa⁷. El VHB presenta el genoma de tipo ADN de virus animal más pequeño conocido en la actualidad⁸.

El genoma viral es muy compacto y consiste en dos hebras de ADN: una hebra corta (o positiva) y una hebra larga (o negativa, dado que su secuencia es complementaria a aquella de su ARN mensajero viral) que contiene cuatro marcos abiertos de lectura solapados (MALs)⁸ (Figura 1B). Estos MALs virales son: el gen P (polimerasa), el cual codifica la ADN polimerasa asociado al virión, con actividad adicional de transcriptasa reversa⁹; el gen C (cápside), codifica para la proteína estructural de la nucleocápside (AgcHB). Este gen es precedido por una corta región pre-C que codifica para una proteína (AgeHB) secretada a la circulación durante la infección viral; el gen S (superficie), codifica para la glicoproteína principal de la envoltura viral, e incluye las especificaciones para el AgsHB (24 kD)^{10, 11}; finalmente, el gen X codifica para una proteína reguladora, la cual constituye un elemento trans-activador de la expresión genética celular y viral¹¹. El VHB emplea para su replicación una transcriptasa reversa carente de una capacidad correctora, lo cual permite la producción de una mayor tasa de errores a nivel genómico y el origen de múltiples

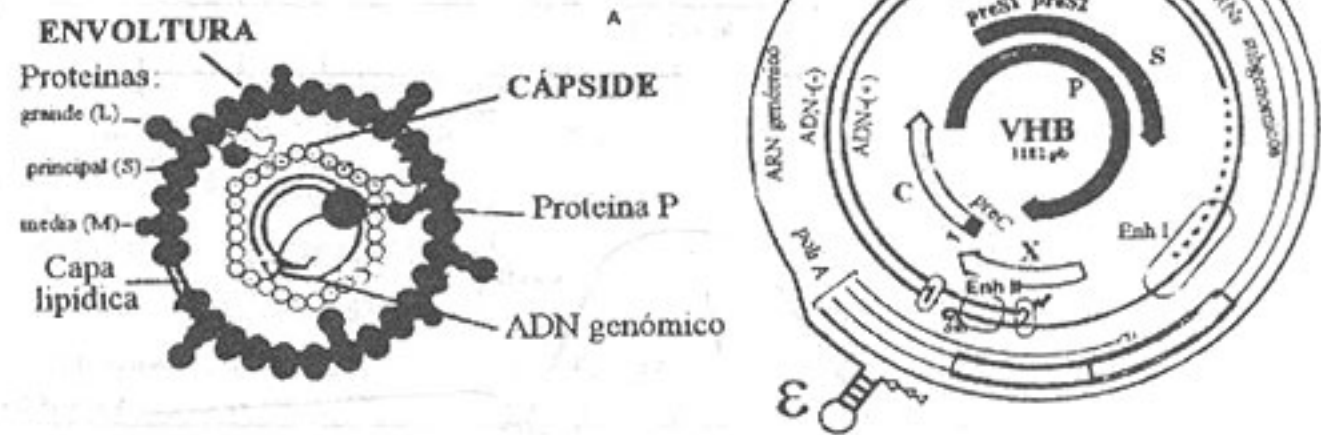
variantes virales^{12, 13}. No obstante, dado el solapamiento de los MALs en el genoma del VHB, esta tasa de errores es menos elevada que un virus ARN.

Transmisión y curso de la infección

El VHB es un virus de transmisión esencialmente parenteral, por lo que cualquier contacto íntimo o sexual, exposición directa o indirecta con sangre o suero contaminados con el virus, puede transmitir la infección. Igualmente se incluye la transmisión vertical o perinatal (paso del virus de una madre infectada a su hijo)⁸.

En un caso típico de infección aguda por VHB, el AgsHB aparece de 2 a 4 semanas antes de observarse niveles anormales de aminotransferasas y luego declina lentamente a niveles no detectables a los 4 a 6 meses. El término de la infección aguda ocurre con la desaparición del AgsHB y la aparición de su anticuerpo específico (anti-HBs), el cual constituye el anticuerpo de neutralización del VHB. La persistencia del AgsHB por más de 6 meses podría definir la condición de portador del mismo (Figura 2). Dado lo anterior, la presencia del AgsHB puede ser señal de una infección aguda o crónica por VHB⁸.

Por otra parte, elevados niveles de anticuerpos contra el antígeno de la nucleocápside viral (anti-HBc) de isotipo IgM dirigidos contra la proteína de la cápside del VHB coinciden con la elevación anormal de las aminotransferasas y la fase sintomática de la enfermedad. Dado que este anticuerpo es producido en respuesta a la síntesis de la proteína de la nucleocápside viral, su aparición en el suero es indicativo de replicación viral. El isotipo IgG anti-HBc aparece inmediatamente después de la IgM anti HBc y permanece de por vida tanto en portadores crónicos del virus como en pacientes recuperados de la infección (Figura 3). Por ende, la presencia de este anticuerpo indica exposición al VHB, en otras palabras,



advierte sobre una infección pasada o activa por el virus en el individuo¹⁴.

El período de “ventana” se caracteriza por la no detección de AgsHB ni de sus anticuerpos específicos (anti-HBs), de manera tal que durante este período la presencia del anti-HBc isotipo IgM es el único indicador de la infección por VHB⁸.

Otro antígeno del VHB denominado antígeno “e” (AgeHB), se detecta en el suero de todos los pacientes infectados por el virus y su aparición coincide o se produce inmediatamente después a la del AgsHB (Figura 2). La presencia de este antígeno se correlaciona con una elevada replicación genómica, alta carga viral e infectividad del suero¹⁵. Se ha sugerido que el AgeHB, transmitido vía placentaria, induce tolerancia de células T, tanto a AgeHB como a AgsHB en un modelo transgénico murino y podría predisponer a neonatos nacidos de madres infectadas por VHB a una infección persistente por un mecanismo similar. En adultos parece que el AgeHB puede funcionar como un inmunomodulador, disminuyendo los mecanismos de eliminación antiviral mediante la inducción de citocinas tipo Th2 (IL-4)¹⁶. La desaparición del AgeHB es seguida por la aparición inmediata del anticuerpo contra el antígeno “e” (anti-HBe). Clínicamente esta seroconversión de AgeHB a anti-HBe es importante ya que es indicio de recuperación, tanto de la infección como de la enfermedad en los casos agudos, mientras que en los portadores de AgsHB indica una baja carga viral⁸.

Figura 1

A. Estructura de una partícula viral infecciosa del VHB. B. Organización del genoma del VHB. S: superficie; preS: Presuperficie; P: polimerasa; X: Gen X; preC: prenucleocápside; C: nucleocápside; 1: secuencia repetida DR1; 2: secuencia repetida DR2; E: señal E (Epsilon).

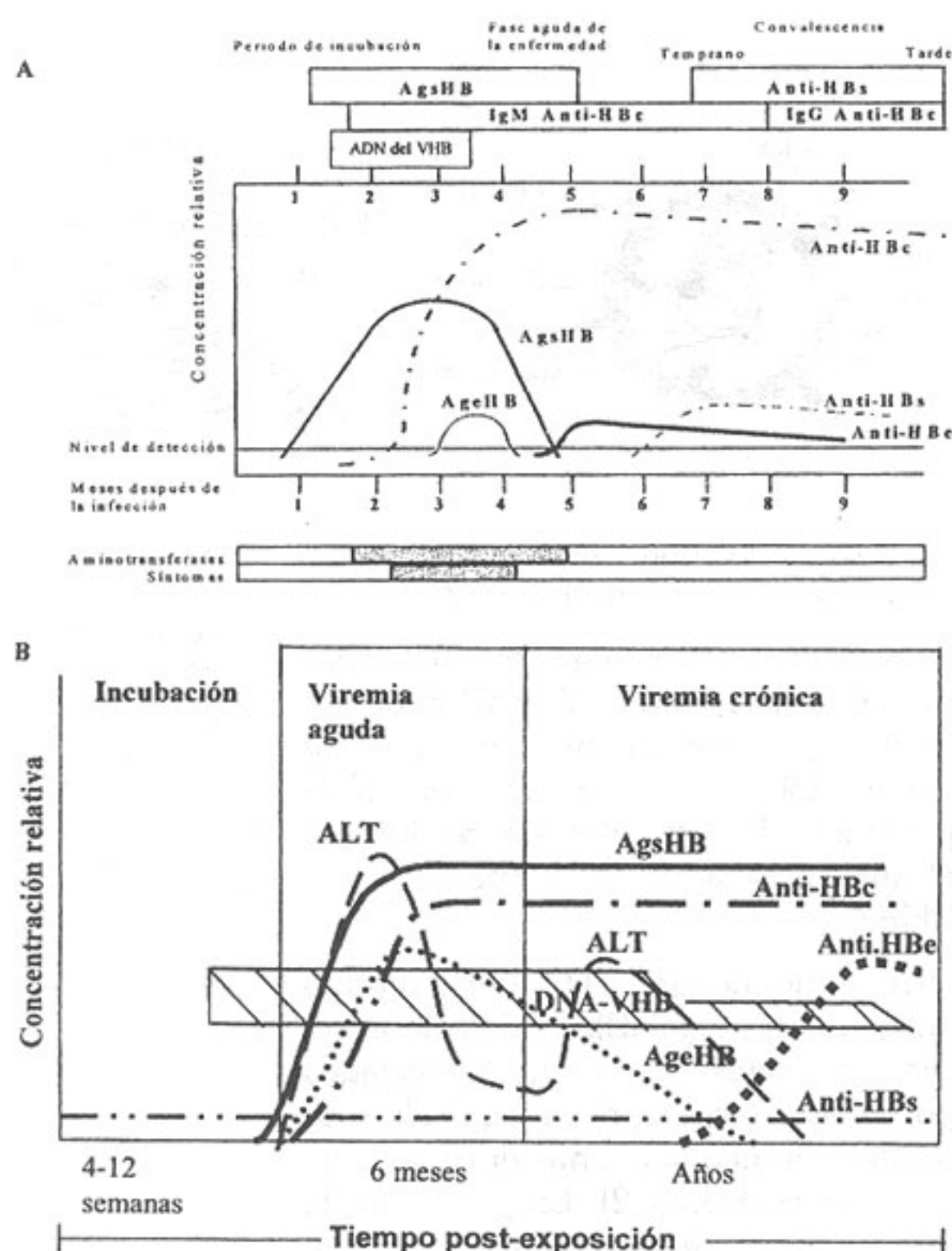


Figura 2

Marcadores serológicos y viremia observados en hepatitis B durante: A. Infección aguda con recuperación de la enfermedad. B. Infección aguda con progresión a cronicidad.

La detección del ADN del VHB en suero permite el monitoreo de la replicación viral y por ende hacer un seguimiento de la evolución de la infección frente al tratamiento antiviral¹⁷. El ADN del VHB puede ser detectado por PCR en pacientes antes del establecimiento de los síntomas de la hepatitis B aguda y de la elevación de las transaminasas (Figura 2A). Los niveles usualmente declinan rápidamente cerca del período de elevación máxima de transaminasas y la seroconversión a anti-HBe. Se ha reportado una disminución significativa de ADN en suero en pacientes con hepatitis B fulminante, lo cual coincide con la propuesta que factores inmunitarios pueden dañar el hígado en el proceso de eliminación del virus. Actualmente, la detección de ADN del VHB en el manejo de pacientes con hepatitis B aguda tiene poca utilidad ya que la determinación de los marca-

dores serológicos específicos permite la obtención de suficiente información diagnóstica y pronóstica de la infección. No obstante, la detección del ADN viral puede ser una herramienta útil en la evaluación de pacientes con patrones serológicos inusuales en la infección aguda, carentes de algún marcador serológico estándar como por ejemplo el AgsHB⁴. Igualmente, la determinación de los niveles del ADN del VHB en suero ha sido utilizado en la evaluación de los dos estadios de replicación viral observados en la hepatitis B crónica¹⁸. El primer estadio consiste en una fase de replicación elevada, la cual comienza inmediatamente después del primer contacto con el virus y se caracteriza por elevados niveles de ADN del VHB y una fuerte respuesta inflamatoria hepática (Figura 2B). Algunos de estos pacientes presentarán una hepatitis activa persistente evidenciada por una elevación de transaminasas séricas y progresarán a cirrosis y posiblemente a carcinoma hepatocelular. Sin embargo, luego de un primer estadio de fase aguda muchos pacientes se convierten en portadores asintomáticos al entrar en una etapa tardía, caracterizada por una fuerte disminución en los niveles de replicación, lo cual es frecuentemente asociado con seroconversión de AgeHB a anti-HBe¹⁷. Luego de esta seroconversión, algunos de estos pacientes pierden espontáneamente el AgsHB y seroconvierten a anti-HBs. No obstante, en algunos casos seronegativos para el AgsHB se ha evidenciado persistencia viral al detectarse ADN del VHB por PCR en portadores asintomáticos¹⁹.

Infección residual por el VHB Posibles causas y mecanismos

Recientemente, ha sido introducido el término de infección residual para definir a aquellas infecciones por VHB producidas en ausencia del AgsHB y en presencia de anticuerpos anti-HBc⁵. Otro patrón serológico inusual es observado en pacientes con infecciones



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

"silentes", caracterizadas por la ausencia de marcadores serológicos del VHB⁶. En ambos casos se ha descrito la detección de bajos niveles de replicación viral mediante determinaciones del ADN del VHB por PCR a partir del suero, hígado y células mononucleares de sangre periférica de estos pacientes⁴. Se han involucrado diversos factores en el origen de las infecciones residuales, tales como: mutaciones en el genoma viral y formación de complejos inmunitarios AgsHB-anti-HBs. Otra posible explicación es la coinfección frecuentemente observada con virus de hepatitis C, cuya proteína de la cápside se ha demostrado que disminuye la replicación del VHB y la síntesis de sus proteínas en líneas celulares de hepatomas¹¹. Por otra parte, recientes investigaciones han demostrado que tanto el VHB como los anticuerpos anti-HBs pueden coexistir en el mismo paciente y que el VHB puede ser encontrado en algunos individuos portadores, positivos para la presencia de anticuerpos anti-HBc en ausencia de AgsHB inmunológicamente detectable^{20, 21}. Estos estudios han evidenciado la circulación del AgsHB en complejos inmunitarios con su anticuerpo específico en dichos pacientes, lo cual puede disminuir o inhibir completamente la detección del AgsHB y de su anticuerpo específico por inmunoensayos estandar¹². Otras investigaciones sobre infecciones residuales por VHB han enfatizado la importancia potencial de mutaciones a nivel de secuencias de los genes preC, promotor de la cápside, preS y S en el fenómeno de persistencia viral^{4, 22}. Se ha propuesto que estas variantes pueden emerger en virtud de mecanismos intrínsecos en su replicación (variantes con deleciones en el promotor de la cápside, algunas variantes pre-C) o debido a una selección positiva por una respuesta inmunitaria humoral o celular del hospedero (variantes con defectos pre-C o mutaciones en el determinante *a* del AgsHB)⁶. A estas últimas variantes originadas en virtud de una presión inmunológica se les denominan mutantes de escape²³.

Emergencia de variantes por presión inmunológica: origen de las mutantes de escape

En el ciclo infeccioso del VHB, una vez que ocurre la penetración de la nucleocápside hacia el citoplasma y la liberación del genoma de ADN de doble cadena parcial, éste es luego translocado al núcleo donde madura a la forma de ADN circular cerrado covalentemente (ADNccc). Después de su asociación a histonas, el ADNccc nuclear es convertido en un mini-cromosoma episomal, el cual sirve como templado para la transcripción de ARNms virales. Esta forma de ADN se origina en el comienzo de la infección a partir de partículas de la cápside citosólicas, lo cual resulta en infección persistente de la célula (Decker, R.H. 1998). Investigaciones recientes han demostrado que el genoma del VHB es detectable como una forma episomal en la mayoría de los individuos asintomáticos con infección residual por VHB, lo cual ha sido evidenciado mediante la detección de ADNccc y ARN intermediario por PCR en hepatocitos de estos pacientes, indicando actividad de replicación viral baja pero persistente en tejido hepático²⁴. Estos mismos autores demostraron además que la cepa predominante en la mayoría de los individuos evaluados con infección residual presentaba mutaciones en la región pre-C a pesar de la presencia de anticuerpos anti-HBe en suero.

Se ha descrito que la presencia de mutaciones en la región pre-C del VHB inhibe la síntesis del AgeHB y originan las denominadas variantes defectivas pre-C. Una de las mutaciones más comunes es una sustitución G por A en la posición 1896, lo cual produce un cambio de TRP²⁸ (TGG) por un codón de parada traduccional (TAG), inhibiéndose la síntesis del AgeHB²⁵. Recientemente, se ha evidenciado la emergencia o selección de variantes defectivas pre-C o pre-S con cambios de genotipo en niños infectados crónicamente con pérdida del AgeHB o

del AgsHB, luego de la seroconversión a anti-HBe o anti-HBs, respectivamente. En estos individuos coinfectados inicialmente con cepas divergentes del VHB, se ha observado la selección de una cepa de genotipo y subtipo diferente a la que predominaba antes de la seroconversión. Las cepas del VHB aisladas en el mundo entero, se han clasificado en 6 genotipos deducidos de comparaciones genómicas e indicados como genotipos A,B,C,D,E y F. Recientemente, se ha reportado un nuevo genotipo encontrado en pacientes crónicamente infectados por el VHB al cual se le ha denominado genotipo G²⁶. Igualmente, basado en estudios sobre antigenicidad del AgsHB, se distinguen 9 serotipos, denominados subtipos del AgsHB y designados como adw2, adw4, adr, adrq-, ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, y ayr²⁷. Así, se ha descrito la selección de cepas genotipo D (subtipo ayw) a partir de una población mixta de cepas en la cual predominaba cepas del VHB pertenecientes al genotipo A (subtipo adw) antes de la seroconversión^{6, 19, 28}. Se ha observado que la emergencia de variantes defectivas pre-S2 o pre-C genotipo D coinciden con una disminución drástica en los niveles de replicación viral en portadores seronegativos para AgsHB y/o AgeHB. Una posible explicación para la emergencia de estas cepas de genotipo diferente podría residir en una fuerte presión selectiva de genomas virales como resultado del paso de un estado de tolerancia inmunológica a un estado de activación del sistema inmunitario con la generación de anticuerpos anti-HBe. Estudios en ratones transgénicos-AgeHB han propuesto que un subgrupo particular de células Th específicas AgcHB/ AgeHB pueden evadir la inducción de tolerancia y ser activadas a pesar de la presencia del AgeHB secretados por cepas salvajes¹⁶. Cuando el AgeHB es convertido entonces, de tolerógeno a inmunógeno, puede ser ventajoso para la población viral reducir su expresión. De esta manera, se ha sugerido que células Th1, B ó CTL activadas,

específicas contra el AgeHB, pueden mediar la selección de cepas AgeHB-negativas⁶. Adicionalmente, se ha sugerido que el cambio de genotipo podría constituir un mecanismo de escape y persistencia viral en algunos individuos con infección residual dado que cepas de distinto genotipo difieren entre sí en numerosos aminoácidos en el MAL preS. De esta manera, se ha descrito que la región preS es altamente inmunogénica a nivel de células T y B, por lo tanto la presencia de mutaciones o cambios de aminoácidos en epítopes específicos de células B y T podrían permitir el escape del virus de su eliminación por el sistema inmunológico al bloquear la exportación del AgsHB^{12, 29}.

Todos los tipos virales contienen el determinante a (aminoácidos 124-147) (Figura 3) y la mayoría de los anticuerpos anti-HBs durante la respuesta inmunitaria normal son anti-a específicos; consecuentemente hay protección cruzada entre diferentes subtipos del VHB³⁰. Se ha demostrado que variaciones en la estructura primaria del determinante "a" cambia marcadamente la conformación predominante en la estructura antigénica del AgsHB (Figura 3). La sustitución del residuo 145 de glicina por arginina es la variación más frecuentemente encontrada en el determinante a de mutantes del gen S²⁹. Las vacunas convencionales contra la hepatitis B no protegen contra la infección y replicación de esta mutante³⁰. Estas variantes son más prevalentes en pacientes con infección residual, negativos para AgsHB ó positivos para antiHBs, lo cual podría favorecer la replicación en presencia de anticuerpos de neutralización en virtud de un mecanismo similar al ya descrito para las mutantes pre-C y pre-S. De esta manera, la carencia de AgsHB detectable en estos pacientes podría deberse a mutaciones en el determinante a y sus alrededores (aminoácidos 98-156), principal blanco para anticuerpos usados en ensayos inmunodiagnósticos (Figura 3), lo cual podría permitir un escape de



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

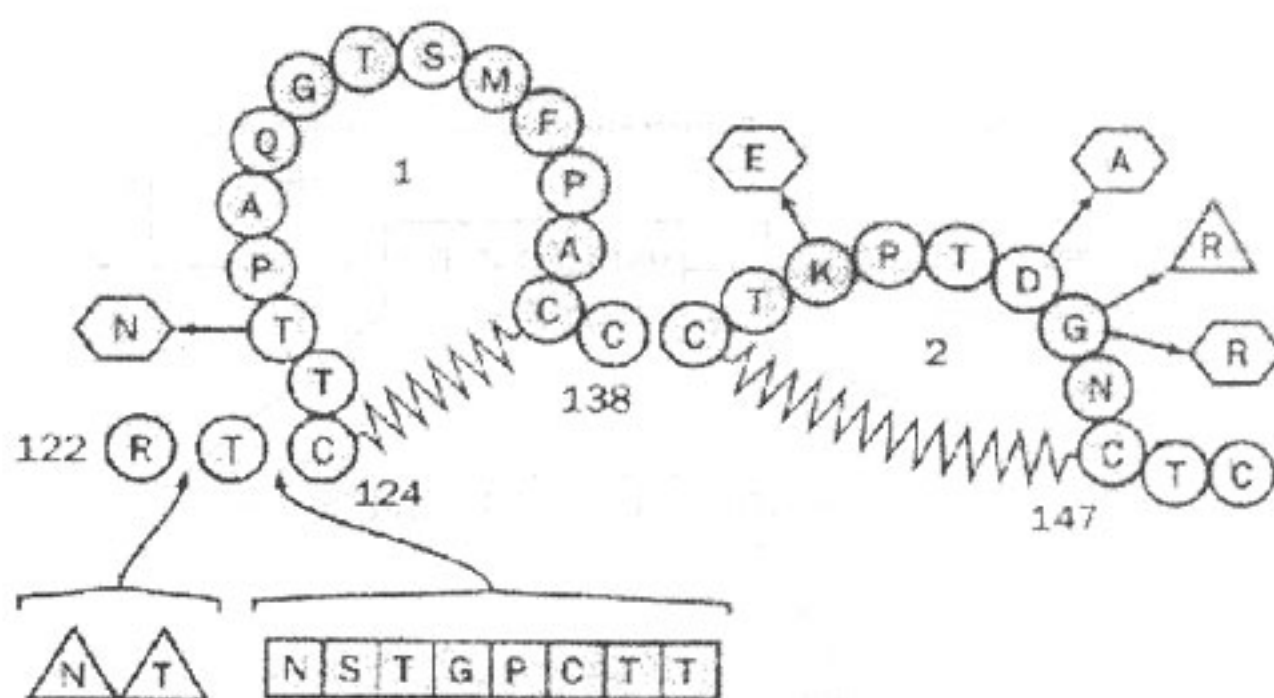
Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

estas variantes al reconocimiento por inmunoensayos utilizados de rutina ¹². Las infecciones serológicamente "silentes", carentes de todos los marcadores del VHB no parecen estar asociadas con variantes del determinante a, sugiriendo que la carencia de AgsHB al igual que otros marcadores serológicos del VHB podría ser debido a bajos niveles de replicación en estos pacientes ^{6, 31}.

Emergencia de variantes por mecanismos intrínsecos a la replicación genómica viral

Alternativamente, variantes defectivas pre-C del VHB pueden emerger debido a mecanismos intrínsecos de su replicación genómica. Se ha propuesto que mutaciones corriente arriba del promotor de la cápside puede afectar la regulación transcripcional del gen pre-C y por ende la expresión de su proteína, lo cual podría explicar la emergencia de cepas negativas para AgeHB a partir de las cepas salvajes. Interesantemente, se ha encontrado que la seroconversión de AgeHB a anti-HBe constituye un evento más temprano e independiente de la conversión genómica en la mayoría de los pacientes con mutaciones en las regiones pre-C y promotora de la cápside. Esta observación permite suponer que estas mutaciones pueden aparecer como un mecanismo de escape luego de la eliminación dirigida por linfocitos T contra hepatocitos con AgeHB en su superficie ²².

Recientemente, se ha propuesto un nuevo mecanismo de escape intrínseco de la biología molecular del virus, el cual controla los niveles de replicación del VHB durante la infección crónica. De acuerdo a este mecanismo, mutaciones en los sitios de unión de factores transcripcionales de interés en la región enhancer I del gen C contribuyen a disminuir la replicación viral de estas cepas mutantes, lo cual puede resultar en una ventaja para la persistencia crónica del VHB. De esta manera, la



○ Aminoácidos del determinante a y Puentes disulfuro

□ Algunas inserciones observadas ○ Otras mutantes asociadas a vacunas

△ Algunas sustituciones observadas

presencia de mutantes de la región enhancer I de la cápside pudiera determinar el cambio de elevados a bajos niveles de replicación viral, el cual es frecuentemente observado durante la infección crónica del VHB ¹⁷. Este mismo mecanismo podría explicar en parte el fenómeno de persistencia viral con bajos niveles de replicación genómica observada en infecciones residuales y silentes.

Por otra parte, se ha observado que variantes defectivas del promotor de la cápside prevalecen en pacientes con infecciones "silentes" ⁶. La región promotora de la cápside regula la replicación del virus y la síntesis del AgeHB, dirigiendo la transcripción de dos ARNm distintos: el ARNm pre-genómico C, el cual sirve para la traducción de las proteínas de la cápside y polimerasa y como templado para la transcripción reversa y el ARNm pre-C a partir del cual es traducido el AgeHB ⁶. El promotor de la cápside está compuesto de un promotor mínimo o básico (BCP), suficiente para el inicio de la transcripción y de secuencias regulatorias corriente arriba (URS) (Figura 4). La mayoría de las mutaciones de la región promotora ocurren en un promotor básico o mínimo denominado BCP,

Figura 3

Estructura del determinante a (aminoácidos 124-147) del AgsHB. Se muestra su conformación formada por puentes disulfuro entre cisteínas. La posición 122 es importante para el reconocimiento de subtipo d/y. Se observan ejemplos de importantes mutaciones: inserciones (). Sustituciones (Δ) en portadores crónicos no vacunados y vacunados ().

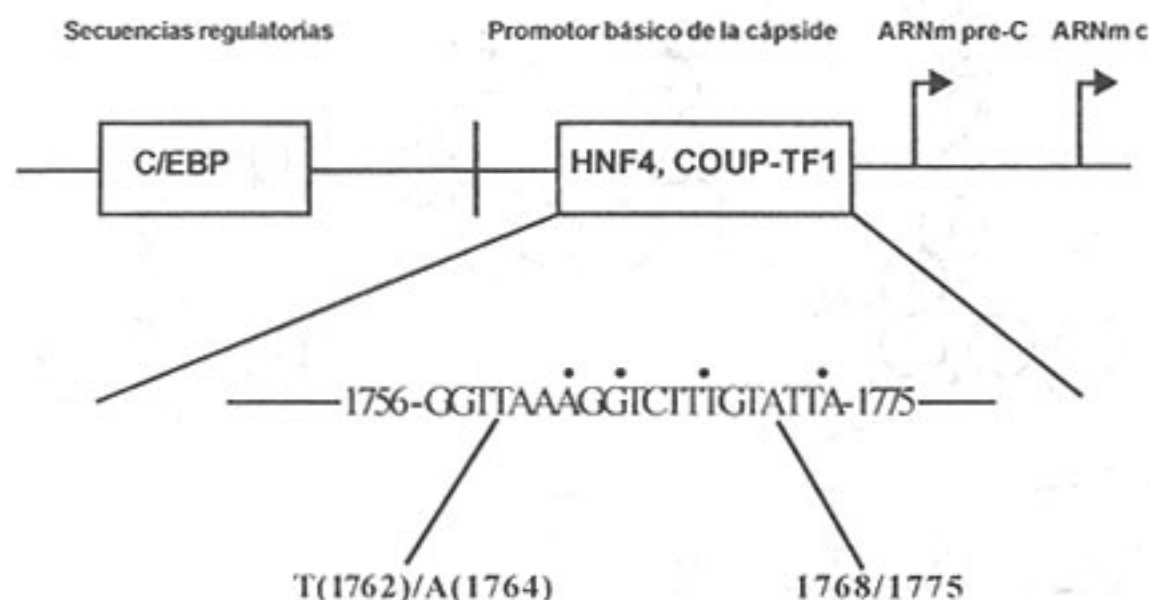


Figura 4

Organización genómica de la región promotora de la cápside. Se señalan las mutaciones más frecuentes en la secuencia correspondiente al sitio de unión de los factores de transcripción HNFs en el promotor básico de la cápside (BCP), asociadas a infecciones ocultas por VHB.

afectando el sitio de unión principal para diversos factores de transcripción celulares (Figura 4)³¹. Este tipo de mutaciones parecen estar igualmente asociadas con infecciones caracterizadas por una viremia extremadamente baja^{6, 17}. Por otra parte, debido a que la región promotora de la cápside se solapa con el gen X, mutaciones en el promotor pueden afectar la estructura y presumiblemente la función de la proteína X. Se ha observado que mutaciones en el BCP pueden afectar al gen X, permitiendo la producción de proteínas X truncadas. Se ha asociado la presencia de mutaciones en el gen X con infecciones "silentes". Sin embargo, el papel patógeno de estas mutantes en este tipo de infección atípica por VHB todavía no está claro³².

La presencia de mutantes de escape y otras variantes virales del VHB en algunos individuos con infección residual o silentes, aparentemente sanos podría explicar en parte los diversos casos de infección de hepatitis B post-transfusión en pacientes receptores, con unidades de sangre negativas para el AgsHB y positivas para anticuerpos anti-HBc o en ausencia de marcadores serológicos para el VHB³³. La presencia de anticuerpos anti-HBc sin otros marcadores serológicos del VHB es frecuentemente encontrado en diversas poblaciones de donantes, inclusive en nuestro país. En un estudio nuestro reciente, realizado en plasmas prove-

nientes de donantes de sangre con marcador exclusivo de anticuerpos anti-HBc se encontró ADN del VHB en un 6% (10 de 167 plasmas) de la población evaluada, observándose una correlación entre elevados niveles de anticuerpos anti-HBc y bajos niveles de anticuerpos anti-HBs con presencia de viremia³⁴. Entre los diversos factores incidentes sobre la presencia de anticuerpos anti-HBc en ausencia de AgsHB, encontramos: a) bajos niveles de replicación del VHB sin la producción de AgsHB detectable; b) obtención de la muestra durante el denominado "período de ventana" de la infección aguda por VHB; c) la pérdida de anti-HBs con el tiempo o falla en el desarrollo de una respuesta de anticuerpos anti-HBs después de la infección; o d) la presencia de variantes virales no detectadas por la mayoría de los ensayos corrientemente usados para la detección del AgsHB y anticuerpos anti-HBs. Adicionalmente, la presencia de infecciones residuales y "silentes" en virtud de la emergencia de variantes con cambios en la estructura antigénica viral puede afectar la sensibilidad de estos inmunoensayos³⁵.

Se ha sugerido que una solución directa a este problema podría ser la utilización de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos altamente sensible (NAT) para evaluar unidades sanguíneas provenientes de donantes con patrones serológicos atípicos de hepatitis B³⁶. Aunque es técnicamente factible la implementación del NAT en el despistaje del VHB a nivel transfusional, la aplicabilidad de esta técnica requiere su evaluación desde el punto de vista clínico y en cuanto a su eficiencia relacionada al costo bajo el contexto del área de salud pública³⁷. Diversos servicios de banco de sangre en Europa, Japón y USA se encuentran actualmente en la fase experimental de evaluación de este tipo de análisis a donaciones sanguíneas^{36, 37}.

El estudio de otros posibles factores y mecanismos de origen de las infecciones ocultas por VHB, tales como las infec-



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)

ciones residuales y silentes mediante la utilización de técnicas de biología molecular contribuirá a un mayor conocimiento sobre la realidad epidemiológica de la hepatitis B tanto en Venezuela como en el resto del mundo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Wands J.R., Fujita Y.K., Isselbacher K.J., Degott C.S.: "Identification and transmission of hepatitis B virus-related variants". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83: 6608-6612.
2. Paterlini P., Driss F., Nalpas B., Pisi E., Franco D., Bertholot P., Brechot C.: "Persistence of hepatitis B and hepatitis C viral genomes in primary liver cancers from HB-Ag-negative patients: a study of a low-endemic area". *Hepatology* 1993; 17: 20-29.
3. Maia M., Takahashi H., Adler K., Garlick R.K., Wands J.R.: "Development of a two-site immuno-PCR assay for hepatitis B surface antigen". *Journal of Virological Methods* 1995; 52: 273-286.
4. Decker R.H.: Diagnosis of acute and chronic hepatitis B viral. *Viral Hepatitis*, second edition, 1998; 14, 201-217.
5. Gandhi M.J., Yang G.G., McMahon B.J., G.N. Vyas: "Hepatitis B virions isolated with antibodies to the pre-S1 domain reveal occult viremia in surface antigen-negative/antibody-positive Alaska native carriers by polymerase chain reaction". *Transfusion*, 2000; 40: 2193-2202.
6. Günther S.: "Naturally occurring variants of hepatitis B virus". *Advances in virus research*, 1999; 25: 25-137.
7. Ganem D.: Hepadnaviridae and their replication. *Fields Virology*, third edition, 1996; 85: 2703-2737.
8. Hollinger F.B.: Hepatitis B Virus. *Fields Virology*, third edition, 1996; 86: 2739-2763.
9. Robinson W.S.: "Hepadnaviridae and their replication". Fields, B.N., et. al. *Virology*. Raven Press, Ltd., N.Y., USA, 1990; 85: 2137-2169.
10. Tiollais P., Buendia M.A.: "Hepatitis B Virus". *Scientific American*, 1991; 264: 116-123.
11. Lee W.: "Hepatitis B infection". *N. Engl. Med.*, 1998; 337: 1733-1745.
12. Weinberger K.M., Zoulek G., Bauer T., Bohm S., Wolfgang J.: "A novel deletion mutant of hepatitis B virus surface antigen". *J. of Med. Virol.*, 1999; 58: 105-110.
13. Summers J., Mason W.S.: "Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate". *Cell*, 1982; 29: 403-415.
14. Lisuka H., Ohmura K., Ishijima A., Satoh K., Tanaka T., Okamoto H., y cols.: "Correlation between anti-HBc titers and HBV DNA in blood units without detectable HbsAg". *Vox. Sang.*, 1992; 63: 107-111.
15. Thomas H.I.J.: "Relative functional affinity of Specific anti-core IgG in different categories of hepatitis B virus infection". *J. of Med. Virol.*, 1997; 51: 189-197.
16. Milich D.R., Chen M.K., Hughes J.L., Jones, J.E.: "The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: A mechanism for persistence". *J. Immunol.*, 1998; 160: 2013-2021.
17. Bock C-T., Malek N.P., Tillmann H.L., Manns M.P., Trautwein C.: "The enhancer I core region contributes to the replication level of hepatitis B virus in vivo and in vitro". *J. of Virol.*, 2000; 74: 2193-2202.
18. Bahn A., Gerner P., Martine U., Bortolotti F., Wirth S.: "Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HbsAg to anti-HBs indicating viral persistence". *J. Hepatol.*, 1997. 27: 973-978.
19. McMahon B.J.: "Chronic carriers of hepatitis B virus who clear hepatitis B surface antigen: are they really "off the hook". *Hepatology*, 1998; 28, 263-265.
20. Maillard P., Pillot J.: "At least three epitopes are recognized by the human repertoire in the hepatitis B virus group a antigen inducing protection; possible consequences for seroprevention and serodiagnosis". *Res. Virol.*, 1998; 149: 153-161.
21. Bläckberg J., Kidd-Ljunggren K.: "Genotypic differences in the hepatitis B virus core promoter and precore sequences during seroconversion from HBeAg to anti-HBe". *J. of Med. Virol.*, 2000; 60: 107-112.
22. Carman W.F., Trautwein C., Deursen F.J., Colman K., Dorman E., McIntyre G., y cols. "Hepatitis B virus envelope variation after transplantation with and without hepatitis B immune globulin prophylaxis". *Hepatology*, 1996; 24: 489-493.
23. Marusawa H., Uemoto S., Hijikata M., Yoshihide U., Koichi T., Kunitada S., y col. "Latent hepatitis B Virus infection in healthy individuals with antibodies to hepatitis B core antigen". *Hepatology*, 2000; 31: 488-495.
24. Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., Karayiannis P., McGarvey M.J., Makris A. y col. "Mutation preventing formation of hepatitis B

e antigen in patients with chronic hepatitis B infection". *Lancet*, 1989; 2: 588-591.

25. Stuyver L., De Gendt S., Van Geyt C., Zoulim F., Fried M., Schinazi R.F., y cols. "A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness". *J. of Gen. Virol.*, 81, 67-74, 2000.
26. Magnus L.O., Norder H.: "Subtypes, Genotypes and Molecular Epidemiology of the Hepatitis B Virus as reflected by sequence variability of the S-Gene". *Intervirology*, 38, 24-34, 1995.
27. Gerner P.H., Friedt M., Oettinger R., Lausch E., Wirth S.: "The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children". *Virology* 245, 163-172, 1998.
28. Carman W.F., Zanetti A.R., Karayiannis P., Waters J., Manzillo G., Tanzi E., y cols. "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus". *The Lancet*, 336, 325-329, 1990.
29. Zuckerman A.J., Zuckerman J.N. "Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants". *J. of Med. Virol.*, 58, 193-195, 1999.
30. Seddigh-Tonekaboni S., Waters J.A., Jeffers S., Gehrke R., Ofenloch B., Horsch A., Hess G., y cols.: "Effect of variation in the common 'a' determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen". *J. of Med. Virol.*, 60, 113-121, 2000.
31. Kramvis A., Kew M.C.: "The core promoter of hepatitis B virus". *J. of Viral Hepatitis*, 6, 415-427, 1999.
32. Fukuda R., Ishimura N., Kushiya Y., Moriyama N., Ishihara S., Chowdhury A., y cols. "Hepatitis B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically 'silent' non-B, non-C chronic hepatitis". *Microbiol. Immunol.*, 40, 481-488, 1996.
33. Saraswat S., Banerjee K., Chaudhury N., Mahant T., Khandekar P., Kumar R., Naik S.: "Post-transfusion hepatitis type B following multiple transfusions of HBsAg-negative blood". *J of Hepatol.*, 25, 639-643, 1996.
34. Gutiérrez C., Leon G., Loureiro C.L., Uzcátegui N., Liprandi F., Pujol F.H.: "Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen". *Clin Diagn. Lab. Immunol.*, 6, 768-770, 1999.
35. Carman W.F., Thomas H., Domingo E. "Viral genetic variation: hepatitis B virus as a clinical example". *The Lancet*, 341, 349-352, 1993.
36. Gerlich W.H., Caspari G.: "Hepatitis viruses and the safety of blood donations". *J. of Viral Hepatitis*, 6, 6-15, 1999.
37. Allain JP.: "Genomic screening for blood-borne viruses in transfusion settings". *Clin. Lab. Haematol.*, 22, 1-10, 2000.



Acta Científica
de la Sociedad
Venezolana
de Bioanalistas
Especialistas

Infección oculta
por el virus
de la Hepatitis B (VHB)