

La hepatitis C y el laboratorio clínico

Palabras clave: Virus hepatitis C, laboratorio.

Key words: Hepatitis C virus, laboratory.

Recibido: 15/07/2008
Aceptado: 21/08/2008

José Roberto Barba Evia*

* División de Auxiliares de Diagnóstico, Unidad Médica de Alta Especialidad. Instituto Mexicano del Seguro Social.

Correspondencia:
José Roberto Barba Evia
Calle 39 por 41 núm. 439, Ex-terrenos «El Fénix»,
Col. Industrial, 97000 Mérida, Yucatán, México.

Resumen

A más de una década del descubrimiento del virus de la hepatitis C (VHC), se han desarrollado toda una variedad de pruebas para su diagnóstico. En el presente trabajo se presentan los datos disponibles sobre la confiabilidad y aplicabilidad de las pruebas diagnósticas.

Abstract

After more than a decade, since the initial description of hepatitis C virus (VHC), a wide range of diagnostic test have been described. In this document available date are presented according on diagnostic test's reliability and applicability.

187

Introducción

El agente que origina la hepatitis C es un virus ARN perteneciente a la familia *Flaviviridae*. Puede agruparse al menos en seis genotipos (1-6) y más de 50 subtipos.¹ Desde el descubrimiento del virus de la hepatitis C (VHC) en 1989, mucho se ha descrito acerca de su epidemiología y patogénesis.²

Características epidemiológicas

La infección con VHC representa una pandemia viral, ya que se ha estimado en 200 millones de individuos afectados alrededor del mundo (un total de 130 países han reportado infección con VHC) con rangos de prevalencia en la población general de 1 a 14% (Estados Unidos 1.8%, México de 0.3

a 1.5%).^{3,4} La viremia persistente está presente en más de 80% de los casos (aproximadamente tres de cada cuatro personas seropositivas),⁴ de los cuales 50 a 70% presentarán enfermedad hepática crónica y 15 a 20% desarrollarán cirrosis hepática en los siguientes 20 años (*figura 1*).^{4,5} Cirrosis es un prerrequisito para el desarrollo de carcinoma hepatocelular relacionada con VHC, lo cual ocurre en un rango de 2 a 3%.⁶

Los factores de riesgo asociados con la infección es posible determinarlos en 57% de los casos. Los factores que han mostrado fuerte asociación son:⁴

- a) Uso de drogas intravenosas (80%).^{4,5}
- b) Receptores de transfusiones sanguíneas (10.8%) antes de 1990. Debido a la introducción de medidas de tamizaje sanguíneo, el riesgo de infección de VHC por esta vía ha dismi-

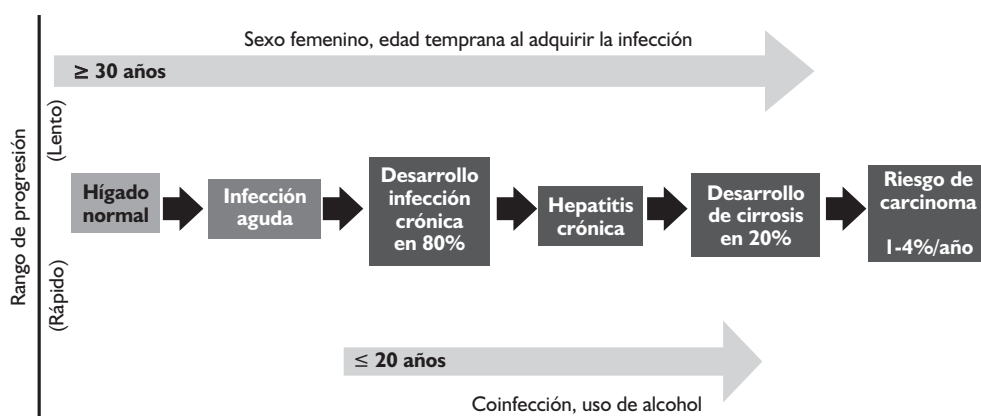


Figura 1. La historia natural de la infección por virus de la hepatitis C (VHC) y su variabilidad de persona a persona. El curso de la infección varía ampliamente entre sujetos. Los factores que reducen el riesgo de progresión incluyen: sexo femenino y edad temprana al momento de adquirir la infección. Los factores que incrementan el riesgo incluyen: consumo de alcohol, edad tardía al momento de infectarse, sexo masculino y coinfección con otros virus. Los pacientes con riesgo favorable a menudo no tienen enfermedad hepática progresiva hasta 30 o más años después de la infección. En contraste, 20% de los pacientes con hepatitis C crónica eventualmente desarrollarán cirrosis, y esto puede ocurrir 20 años o menos posterior a la infección, especialmente en aquellos pacientes que ingieren alcohol o coinfectados con VIH-I o con virus de hepatitis B. Una vez que la cirrosis se establece, el riesgo de carcinoma hepatocelular es de 1-4% por año. Tomado y traducido de: *N Engl J Med* 2001; 345 (1): 41-52.

nuido (se ha estimado en 1 por cada 100,000 unidades). De acuerdo con la Secretaría de Salud en México, la prevalencia de VHC en donadores durante los años 1999 a 2002 tuvo un rango de 0.68 a 0.80%. Otras rutas parenterales incluyen trasplante de órganos y tatuajes.

- c) Transmisión de tipo vertical. Es infrecuente y de bajo riesgo (menos de 6% de los niños de madres VHC positivas), y generalmente está asociada con coinfección con VIH-I en la madre.⁴
- d) Vía sexual. Parece ser un medio ineficiente en comparación con la infección con VIH-I. Sin embargo, al igual que en el caso anterior, la coinfección con VIH-I incrementan el riesgo de la transmisión por esta vía.^{4,5}
- e) Transmisión nosocomial. Ha sido documentada e incluye infección de paciente a paciente, por colonoscopia, diálisis y durante cirugía. La prevalencia de infección por VHC no es más alta entre los trabajadores de la salud que en el resto de la población; las lesiones con agujas son la forma más común de transmisión

nosocomial del virus. Se ha estimado los riesgos comparativos de transmisión por lesiones con agujas de los siguientes tres virus: VHB es transmitido en 30% de las exposiciones, VHC en 3% (1.8%; CDC 1997), y VIH-I en 0.3%. Estos números están influenciados por el tamaño y profundidad del inóculo, así como por el calibre de la aguja.⁴

En algunos casos no se puede identificar la causa.^{4,5}

Características del virus

Es un virus ARN perteneciente a la familia *Flavivirus*. Está relacionado estrechamente con otros virus de esta familia, como son los virus de la hepatitis G, fiebre amarilla y dengue. El objetivo natural del VHC son los hepatocitos y, posiblemente, los linfocitos B. La replicación viral es extremadamente «robusta» y se ha estimado que más de 10 trillones de viriones son producidos por día en la fase crónica de la infección. La replicación ocurre mediante ARN dependiente de ARN polimerasa. El VHC codi-

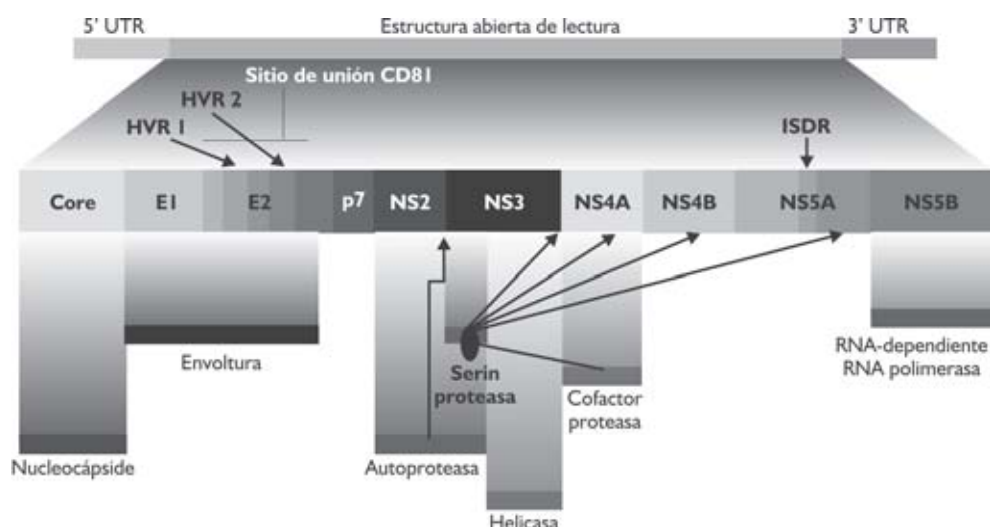


Figura 2. El genoma del virus de la hepatitis C (VHC) y expresión de poliproteínas. VHC, una simple cadena de ARN viral de 9.5 Kb, consistente de una simple estructura abierta de lectura y dos regiones intraducibles (UTRs). Esto codifica una poliproteína de aproximadamente 3,000 aminoácidos, que están partidas dentro de proteínas simples por una señal interna peptidasa en la región estructural y que codifica proteasas del VHC en la región no estructural (NS). La región estructural contiene la proteína core y dos proteínas de envoltura (E1 y E2). Dos regiones en E2, denominadas regiones hipervariables 1 y 2 (HVR 1 y HVR 2), muestran extrema variabilidad de secuencias, resultado de la presión selectiva por anticuerpos virus-específicos. E2 también contiene los sitios de unión para CD81, el receptor o correceptor putativo del VHC. Las proteínas no estructurales tienen asignadas funciones como proteasas (en el caso de NS2, NS3 y NS4A), helicasa (en el caso de NS3), y ARN dependiente de ARN-polimerasa (NS5B). Aunque la estructura de cristal de NS3 y NS5 es conocida, la función y propiedades de otras proteínas (como la p7) están menos caracterizadas. Una región en NS5A ha sido vinculada a la respuesta a la terapia con interferón alfa denominándola región determinante de sensibilidad a interferón (ISDR). Sin embargo, la relevancia e importancia de esta región es incierta. Tomado y traducido de: *N Engl J Med* 2001; 345 (1): 41-52.

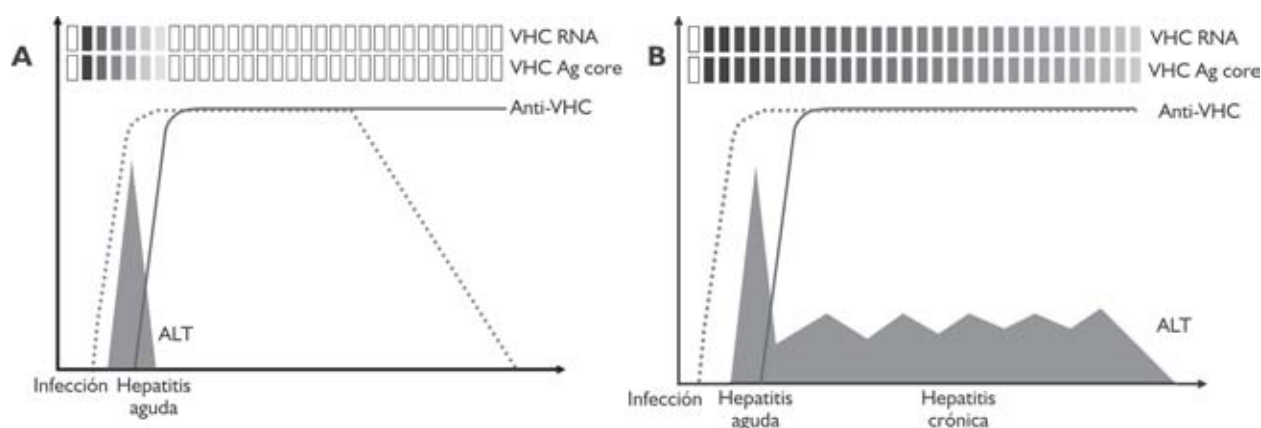
fica una simple poliproteína de 3,011 aminoácidos, los cuales son procesados en 10 proteínas estructurales y reguladoras. Los componentes estructurales incluyen el core y dos proteínas de envoltura (figura 2). Dos regiones de la proteína de envoltura E2, denominadas regiones hipervariables 1 y 2, tienen un extremado rango de mutación, que se cree son resultado de la presión selectiva por anticuerpos virus-específico. E2 también contiene los sitios de unión de los CD81 expresados por los hepatocitos y linfocitos B.⁴

Seis genotipos del VHC, distintos pero relacionados, y múltiples subtipos han sido identificados con base en modelos moleculares. Los genotipos 1a y 1b, seguidos del 2 y 3, son comunes en Estados Unidos y Europa Occidental; el ge-

notipo 4 es común en Egipto, el 5 en Sudáfrica y el 6 en el Sudeste de Asia. El conocimiento del genotipo es importante por su valor predictivo en términos de respuesta a la terapia antiviral, con mejores respuestas asociadas con los genotipos 2 y 3 que con el genotipo 1.⁴

Diagnóstico de laboratorio

La infección con VHC es poco diagnosticada durante la fase aguda de la infección. Las manifestaciones clínicas pueden ocurrir entre las semanas siete y ocho (rango: dos a 26) después de la exposición al VHC, pero la mayoría de las personas no presentan síntomas o sólo síntomas leves. La hepatitis fulminante ha sido descrita en este periodo. En casos en los cuales han sido



descritos síntomas de hepatitis aguda, usualmente consisten en: ictericia, malestar general y náusea. La infección se convierte en crónica en la mayoría de casos y típicamente se caracteriza por un periodo prolongado libre de síntomas. Se ha estimado que 74 a 86% de las personas tienen viremia persistente. Por lo tanto, una estrategia ideal de pruebas debe identificar correctamente un individuo infectado (seroestatus) como también a individuos actualmente infectados (estatus viral).^{4,7}

En países desarrollados, la introducción de tecnologías que utilizan ácidos nucleicos se encuentran disponibles para detectar enfermedad infecciosa en donadores de sangre, pudiendo reducir este riesgo a casi cero por acortamiento del período de ventana; sin embargo, el inconveniente de éstas es su elevado costo. Por citar un ejemplo, datos epidemiológicos en Francia, indican que la prevención de la infección por VHC mediante la utilización de estas técnicas puede tener un costo cercano a 1.2 millones de euros. Inmunoensayos enzimáticos (EIA, por sus siglas en inglés) son utilizados en 80% de los bancos de sangre, y en 20% se utilizan técnicas de hemoaglutinación indirecta. En cuanto a lo concerniente a las pruebas

confirmatorias, los ensayos recombinantes inmunoblot son los más utilizados.⁸

Cuatro marcadores virológicos de infección por VHC pueden ser utilizados en el manejo de pacientes infectados, denominados: a) Genotipo del VHC, b) ARN del VHC, c) antígeno core de VHC y d) anticuerpos anti-VHC. La cinética de estos marcadores durante la resolución espontánea aguda y hepatitis C crónica se muestra en la figura 3.⁹

El diagnóstico virológico y el monitoreo de la infección por virus de la hepatitis C se basa en dos categorías de pruebas de laboratorio:

- A. Ensayos serológicos de detección de anticuerpos específicos contra VHC (anti-VHC o pruebas indirectas) en las que se utilizan métodos inmunológicos.^{4,5}
- B. Pruebas que pueden detectar, cuantificar o caracterizar los componentes de las partículas virales de VHC, como son ARN del VHC y antígeno «core» o central (pruebas directas)^{4,5}.

Pruebas virológicas directas e indirectas juegan un papel en el diagnóstico, decisión terapéutica, y evaluación virológica en respuesta al tratamiento.^{1,9,10}

Técnicas virológicas

A. Técnicas inmunológicas: El descubrimiento del VHC permitió el desarrollo de ensayos diagnósticos basados en anticuerpos dirigidos contra péptidos virales recombinantes. Estas pruebas utilizan técnicas inmunoenzimáticas y se usan ampliamente para detectar y, algunas veces, cuantificar anticuerpos específicos en líquidos corporales. El periodo de ventana entre la infección con VHC y la detección de anticuerpos específicos varía de paciente a paciente. Con los ensayos actuales, la seroconversión ocurre en promedio de siete a ocho semanas antes de manifestarse la infección. Los anticuerpos anti-VHC pueden persistir a lo largo de la vida, decrecer o gradualmente desaparecer después de muchos años. Estos anticuerpos persisten indefinidamente en pacientes que desarrollan infección crónica. Aparente serorreversión y/o seroconversión puede ocurrir en pacientes inmunodeprimidos, en quienes la presencia de la infección está confirmada por la persistencia del ARN del VHC. Las principales pruebas incluyen: inmunoensayo enzimático e inmunoblot.^{1,9,10}

1. Inmunoensayo enzimático (ensayo serológico diagnóstico): La mayor parte de las pruebas de laboratorio emplea ensayos enzimáticos inmunoabsorbentes (EIA) (comúnmente denominados ELISA). Constituye una prueba barata con relativa buena sensibilidad y especificidad. El tamizaje para la infección por VHC típicamente comienza con la medición de anticuerpos dirigidos contra proteínas virales mediante anticuerpos séricos o plasmáticos o antígenos virales, los cuales son captados sobre pozos de placas microtituladas, utilizando su correspondiente antígeno o anticuerpo específico (generalmente monoclonal), respectivamente. Los complejos antígeno-anticuerpo son revelados en una reacción enzimática colorimétrica. Posteriormente son «leídos» en un espectrofotómetro; el resultado se expresa como el radio de la densidad óptica

de la muestra⁶, es decir, el resultado es interpretado por la comparación de las lecturas de absorbancia con un valor de corte definido. Debido a que esta absorbancia provee un resultado cuantitativo, usualmente se reporta la prueba como positiva o negativa.⁹ Recientemente, algunos investigadores han defendido el dividir la densidad óptica en tres niveles: positivo alto, positivo bajo y negativo. Muestras positivo alto pueden ser designadas claramente como positivas con poca probabilidad de presentarse falsos positivos. Muestras reportadas como positivo bajo requieren la realización de pruebas confirmatorias. Sin embargo, existe un lapso en el cual no se detecta una prueba positiva, aun cuando el individuo esté infectado; lo cual ocurre cuando la infección ha sido adquirida recientemente. A este lapso se le conoce como «periodo de ventana». La extensión de los periodos de ventana para las pruebas de escrutinio actuales reportadas en la literatura es de 66 días (38-94 días) para anti-VHC con EIA de tercera generación.^{7,11}

Durante el decenio anterior se desarrollaron tres generaciones de EIA para la detección de anti-VHC. El uso de la primera generación de estos ensayos fue autorizado por la *Food and Drug Administration* (FDA) en 1990, incorporaban un antígeno «fusionado» de superóxido dismutasa humana (SOD) y un polipéptido del VHC (CI00-3) obtenido de la región no estructural NS4 del genoma viral. Esta prueba aportó dos importantes avances en el conocimiento de la infección por VHC: permitió la detección de anticuerpos contra el virus en donadores de sangre y permitió establecer el diagnóstico de lo que hasta entonces se conocía como hepatitis no-A, no-B. Esta primera generación de ensayos carecían de sensibilidad y especificidad, debido a numerosos resultados falsos positivos en poblaciones de bajo riesgo, debido probablemente a uniones inespecíficas entre inmunoglobulinas plasmáticas o a contaminantes presentes en las preparaciones de antígenos, que fusionan partes inespecífi-

cas de los antígenos recombinantes o agentes bloqueadores.^{10,12}

La segunda generación se desarrolló en 1992, incorporando antígenos de la nucleocápside (C22) y región genómica NS3 (C33). Estas pruebas son más sensibles y específicas que las de la primera generación. Esta segunda generación permitió acortar el periodo de ventana de la detección de anti-VHC con respecto a la primera generación de 16 a 10 semanas. Los resultados falsos positivos de estas últimas casi se limitaron a poblaciones de bajo riesgo, mientras que los resultados falsos negativos pueden obtenerse en dos circunstancias particulares: 1) el periodo de ventana que prosigue a la infección aguda, 2) poblaciones de pacientes inmunocomprometidos que no generan anticuerpos detectables aun después de varios años de estar infectados.^{10,12}

La tercera generación de estos ensayos se introdujeron incorporando antígenos putativos de la nucleocápside: regiones NS3, NS4 y NS5, la cual sustituyó la proteína 5-I-I utilizada en las generaciones anteriores. Esta generación presenta una sensibilidad y especificidad de 97 a 99% en población de alto riesgo y han «acortado» el tiempo medio de la seroconversión de dos a tres semanas.^{1,10,12}

Hoy en día, los laboratorios utilizan EIA de segunda y tercera generación.^{5,9} Anti-VHC falso-positivo son raros debido a que los pacientes a quienes se les realiza este estudio de forma inicial tienen evidencia de enfermedad hepática; sin embargo, diversos estudios en los que se ha utilizado EIA de segunda y tercera generación han demostrado que muestras con valores de absorbancia justamente por encima del valor de corte tienen una probabilidad significativamente alta de presentar resultados falsos-positivos comparados con aquéllos con valores elevados.^{12,14} En población de alto riesgo, 70 a 100% de los EIA de segunda generación resultan verdaderos positivos, y menos de 50% de los EIA repetidamente reactivos son verdaderos positivos en

población de bajo riesgo. Una explicación para estos «presumibles» EIA falsamente positivos es la presencia de anticuerpos contra el superóxido dismutasa, el cual se encuentra relacionado con el antígeno C100-3 del VHC utilizado en estos ensayos.¹³ La vacunación antiinfluenza puede causar resultados falsos-positivos para anti-VHC y otras pruebas serológicas.¹⁴⁻¹⁷

Un EIA positivo en un paciente con enfermedad hepática crónica es suficiente para el diagnóstico de infección con VHC y una prueba confirmatoria de anticuerpos puede no ser necesaria. Para este tipo de pacientes se sugiere realizar prueba confirmatoria sérica con PCR para ARN del VHC.¹⁶

2. Enzimoimmunoensayo de micropartículas de tercera generación (MEIA): Esta prueba permite detectar anticuerpos contra las proteínas estructurales y no estructurales del virus (HCr43, c200, c100, NS5 recombinantes). Es una prueba de fase sólida, en cuya fase final un anticuerpo acoplado a una enzima actúa sobre un sustrato y origina un producto fluorescente. Se mide la fluorescencia que la reacción enzimática produce y es proporcional a la cantidad de anticuerpos unidos.¹⁰ En pacientes con desórdenes inmunológicos que pueden contribuir a una respuesta de anticuerpos baja o ausente como se ha observado en pacientes en hemodiálisis, puede contribuir a falsos negativos en estas pruebas. Reactividad baja de un MEIA puede ser causada por anticuerpos contra los microorganismos utilizados para la clonación y expresión. De esta manera, ha sido descrito que los péptidos sintéticos son más específicos; sin embargo, proporcionan menor sensibilidad. Altos niveles de inmunoglobulina G puede conducir a la unión no específica del fragmento Fc de la fase sólida, resultando en reactividad falsa en la prueba. Por lo tanto, altos rangos de reactividad se encuentran en pacientes con artritis reumatoide, enfermedad de Sjögren, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria o crioglobulinemia mixta.¹⁸

3. Detección y cuantificación del antígeno core:

La cápside icosaédrica del VHC está formada por la polimerización de la proteína core del VHC, una fosfoproteína estructural compuesta de los primeros 191 aminoácidos de la poliproteína viral. Nuevas técnicas de EIA permiten detectar el antígeno central o core en muestras biológicas. Estas pruebas demostraron un alto grado de concordancia con los resultados obtenidos mediante PCR y, por lo tanto, pueden utilizarse como un marcador de replicación viral.^{9,10}

Varios estudios demostraron que el antígeno central puede detectarse uno a dos días después del ARN del VHC durante el periodo previo a la seroconversión. La titulación del antígeno core del VHC correlaciona estrechamente con los niveles de ARN del VHC y, por lo tanto, puede ser utilizado como un marcador subrogado de replicación viral. Un estudio reciente comprobó que un picograma/mL de antígeno central es equivalente, en promedio, a 8,000 UI/mL de ARN del VHC.^{9,10}

4. *Inmunoblot (ensayo confirmatorio)*: Las pruebas que más se utilizan para confirmar una prueba EIA positiva para VHC incluyen *Recombinant Immunoblot Assay* (RIBA) y *Line Immunoassay* (LIA-TEK), también detectan anticuerpos específicos, pero utilizando antígenos del VHC inmovilizados sobre una faja de nitrocelulosa desvestida en lugar de la placa microtitulada. Se consideran una prueba más cara y con mejor especificidad comparado con el EIA, pero existen pocos datos acerca de su sensibilidad. Los resultados pueden ser positivos, indeterminados o negativos y la interpretación depende del tipo y la versión del ensayo, así como de los criterios del fabricante. La reacción positiva se caracteriza por la aparición de bandas coloreadas de posición específica, requiriéndose por lo menos la presencia de dos bandas reactivas. La interpretación de la prueba puede ser visual o automatizada.⁷ Uno de los problemas de la utilización de esta metodología es la

interpretación de resultados indeterminados sin detección de VHC-ARN, ya que está demostrado que los individuos que sólo poseen reactividad contra C100-3 o contra 5-I-I rara vez son virémicos.^{7,10,17}

Un primer ensayo inmunoblot recombinante (RIBA-100) fue desarrollado inmovilizando separadamente los antígenos C100-3, 5-I-I, y SOD. La segunda generación fue desarrollada con antígenos provenientes de la nucleocápside (C22) y NS3 (C33) en adición a C100-3 y 5-I-I. Diversos estudios han sugerido que esta segunda generación de pruebas detecta tempranamente la infección con VHC en casos agudos y son más frecuentemente positivos en casos crónicos. Un RIBA de segunda generación positivo está asociado con viremia con VHC por PCR en 88-98% de los casos.¹⁰

Una prueba RIBA positiva está asociada a reactividad con dos o más de los antígenos y, en la mayoría de los casos (63%), se detecta reactividad a los cuatro antígenos. Un resultado indeterminado muestra reactividad para alguno de los antígenos. Diversos estudios han mostrado que la reactividad con C100-3 o 5-I-I raramente está asociada con positividad a PCR y puede ser considerada como resultado falso positivo. La mayoría de los pacientes con sólo anticuerpos contra c33 y cerca de la mitad de aquéllos con anticuerpos contra c22 serán PCR positivos y, por lo tanto, representan resultados verdaderamente positivos⁵.

La tercera generación de ensayos RIBA ha sido desarrollada incorporando c22 y c100-3 sintéticos, c33 recombinante y un antígeno NS5 recombinante. Esta generación ha mostrado ser positiva en muchos de los casos RIBA de segunda generación indeterminados y se correlaciona con viremia de VHC. Resultados indeterminados han sido observados con ARN de VHC detectados en 58% de los casos. Estos pacientes pueden ser evaluados por la evidencia de la replicación viral y enfermedad hepática.¹¹

B. Técnicas de biología molecular:⁵ Estas técnicas son utilizadas para la detección y cuantificación del genoma viral (viremia) en fluidos corporales por medio de métodos de amplificación (de blanco y de señal). Constituye un índice directo de la replicación del VHC y confirma la presencia de infección activa. Las secuencias de genoma viral pueden también ser analizadas para propósitos de genotipificación, más frecuentemente por medio de una secuenciación directa o hibridación inversa.⁹

1. Técnicas de amplificación de blanco: Un gran número de copias del genoma viral (amplicons) son amplificadas en una reacción enzimática cíclica. Los amplicons pueden entonces ser detectados con varios métodos, y la cantidad de genoma viral en muestras clínicas pueden ser cuantificados.⁹

El método de laboratorio más sensible para esta determinación es la prueba de amplificación de ácidos nucleicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa, a través de una transcripción inversa (PCR-RT, por sus siglas en inglés). Este método utiliza diferentes temperaturas y una enzima (ADN polimerasa termoestable). La detección inicial de VHC por PCR utiliza primers derivados de regiones heterogéneas no estructurales del virus. La sensibilidad de estos ensayos está en el rango 500-1,000 equivalentes/mL o de 100 moléculas/mL de suero.¹⁰

Para lograr estas condiciones, es necesario separar el plasma o suero de la sangre entera en las cuatro horas posteriores a la extracción, seguida de una rápida conservación de la muestra a -70 °C. Una vez aislado el ARN viral, debe convertirse en ADN complementario (ADNc) y después amplificarse mediante una polimerasa bacteriana. Es necesario mantener cada una de las etapas del proceso físicamente separadas: la extracción, la amplificación y la detección de los ácidos nucleicos.¹⁰

Varias posibilidades deben considerarse ante la presencia de anticuerpos anti-VHC y una prueba

de ARN no detectable: 1) infección crónica con niveles fluctuantes de ARN del VHC, 2) curación después de una infección con VHC, 3) supresión de la replicación mediante tratamiento antiviral, 4) una prueba EIA con resultado falso positivo y 5) un falso negativo de la PCR o niveles de ARN por debajo del límite de detección.¹⁰

Las causas de un anti-VHC negativo y ARN positivo pueden ser: 1) periodo de ventana durante la infección aguda, 2) seronegatividad por deficiencia inmunitaria o inmunosupresión y 3) falso negativo de la prueba de EIA o falso positivo de la prueba de PCR.¹⁰

2. Pruebas cuantitativas para la detección del ARN del VHC: La presencia de ARN de VHC en sangre periférica es un marcador fiable de replicación activa de VHC, la cual se lleva a cabo principalmente en el hígado. El genoma es detectable en suero dentro de una o dos semanas después de la infección. Éste generalmente se incrementa alcanzando picos, antes de desaparecer cuando la infección se resuelve espontáneamente. En contraste, en muchos pacientes que progresan a infección crónica, el decremento del ARN del VHC es gradualmente lento, entonces se estabiliza; ocasionalmente, sin embargo, ARN del VHC puede ser indetectable pocos días o semanas antes de reaparecer, alcanzando una meseta. Los niveles del ARN del VHC son estables durante el tiempo en que el paciente presenta infección crónica. Se ha estimado que la vida media de los viriones del VHC en la circulación general es del orden de tres horas y la producción viral es de 10^{12} viriones por día. La medición de la cantidad de ARN del VHC presente en el suero o el plasma de un paciente infectado se denomina carga viral. Los niveles del ARN viral no son afectados por la severidad de la afectación hepática, excepto en pacientes que presentan enfermedad hepática terminal.^{9,10}

Los métodos que se utilizan para medir la carga viral son:^{5,10}

- Amplificación del ARN del VHC mediante PCR-RT.^{5,10}
- Amplificación de la señal mediante cadenas ramificadas de ADN (DNAb): esta técnica consiste en una combinación de oligonucleótidos sintéticos usados como sondas que se pegan y miden las cantidades de ARN viral presente en la muestra en estudio. El ácido nucleico del virus se captura en una fase sólida mediante sondas sintéticas. Otras sondas se pegan a la secuencia blanco y entre sí de manera secuencial e incluyen sondas amplificadoras ramificadas de ADN. Por último, múltiples copias de sondas marcadas con fosfatasa alcalina se hibridizan con cada sonda amplificadora en el complejo inmovilizado. La adición de un sustrato quimioluminiscente cortado por la fosfatasa alcalina permite la emisión de luz en forma proporcional a la cantidad de la secuencia blanco en la muestra en cuestión.^{5,10}
- Amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico. Consiste en una amplificación isotérmica del ARN del VHC mediante tres enzimas activas a 41 °C: AMV-RT, ARN-asa H y T7 ARN polimerasa.^{5,10}

La Organización Mundial de la Salud estandarizó las unidades de cuantificación del ARN del VHC; como resultado, todos los ensayos cuantitativos expresan la carga viral en UI/mL. El valor de corte de detección de las pruebas de uso convencional varía entre 30 y 615 UI/mL; el valor superior de detección oscila entre 500,000 y 7'700,000 UI/mL.^{5,10}

3. *PCR en tiempo real para detección y cuantificación del ARN del VHC:* Este procedimiento permite amplificar y detectar la secuencia de ácido nucleico en un tubo único y un colorante fluorescente adosado a una sonda específica para VHC, permitiendo la detección del ARN viral generado por la amplificación. Cada ciclo sucesivo de amplificación exponencial del producto de PCR produce además una amplificación ex-

ponencial de la intensidad del producto fluorescente, que un detector lee en tiempo real. Algunas ventajas de esta técnica son: 1) no requiere un gel de agarosa para detectar el producto de la amplificación, 2) posee una especificidad incrementada porque la prueba utiliza cebadores específicos además de una sonda específica, 3) excelente reproducibilidad, 4) todos los genotipos del VHC pueden amplificarse con la misma eficiencia y 5) permite cuantificar la carga viral. La utilización de esta técnica permite además la detección de las cadenas negativas y permite evaluar el cociente entre la cadena positiva y negativa, lo que constituye un importante indicador de la replicación intrahepática.¹⁰

4. *Detección cualitativa de ARN del VHC:* Los ensayos de detección cualitativa de ARN del VHC son significativamente más sensibles comparados con muchos de los ensayos cuantitativos disponibles. Su principio se basa en la amplificación blanco, utilizando cualquiera de los dos métodos PCR o amplificación mediada por transcripción (TMA por sus siglas en inglés). La especificidad de este método es de 98-99%⁶.

C. Determinación de genotipos del VHC (genotipificación): Constituye una característica intrínseca de la transmisión del VHC y no cambia durante el curso de la infección. El «estándar de oro» para la genotipificación es la secuenciación directa de la región NS5B ó EI. La diversidad del genoma del VHC permite clasificarlo en genotipos, subtipos y cuasiespecies. El árbol filogenético está constituido por seis genotipos mayores (designados del I al 6) y numerosos subtipos (designados con letra a, b, c, d, e, f, g; por ejemplo: Ia, Ib, Ic, etcétera). Los errores de tipificación son poco comunes, pero los errores de subtipificación pueden ocurrir en 10 a 25% de los casos; sin embargo, éstos son de poca importancia clínica. Están disponibles varias tecnologías para la determinación del genotipo del VHC.^{1,9,10}

- Secuenciación directa del genoma viral: constituye el método más directo y preciso, y se

considera el estándar de oro. Las regiones apropiadas para la secuenciación son: el core, E1, NS4B y NS5B.^{9,10}

- Secuenciación con un único didesoxinucleótido o el análisis de restricción de fragmentos amplificados por PCR mediante la presencia de polimorfismos de secuencias específicas de tipo, ya sea por hibridación o técnicas RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*). La mayor parte de estos análisis se basa en la región 5' no codificante, cuyo polimorfismo puede detectarse mediante hibridación con sondas específicas o por análisis RFLP de los fragmentos de PCR.^{9,10}
- Hibridación inversa utiliza sondas (oligonucleótidos) específicas de genotipos embebidas en un soporte sólido de nitrocelulosa. Los productos amplificados de la región 5'NC del genoma viral se hibridizan en forma diferencial con las secuencias complementarias específicas de genotipo embebido sobre la tira de nitrocelulosa.^{9,10}
- Ensayo inmunoenzimático pueden detectar anticuerpos específicos de los diferentes genotipos. La región del genoma viral que se utiliza es la NS4 debido a que los genes de esta región codifican epítomos específicos que permiten diferenciar los genotipos 1, 2 y 3. La principal ventaja de estos métodos son: costo menos elevado, simples de realizar, así como proveer resultados interpretables en aproximadamente 90% de los pacientes inmunocomprometidos con VHC. Desventaja en la proporción elevada de individuos no inmunorreactivos contra la región NS4 (como son inmunocomprometidos o de reciente infección con el virus). Estas técnicas permiten la identificación del tipo (1 al 6), pero no la diferenciación entre subtipos porque las diferencias antigénicas entre subtipos son mínimas.^{9,10}

D. Métodos de estudios de las cuasiespecies del VHC: Las cuasiespecies virales com-

prenden un «genoma maestro», que es predominante en términos cuantitativos, y una multitud de «genomas menores», que representan proporciones variables de la población total. La «secuencia maestra» puede o no coincidir con la secuencia consenso de las cuasiespecies, que se define como la secuencia que contiene los nucleótidos que se detectan con más frecuencia en cada posición. Para estudiar las cuasiespecies del VHC, el ARN extraído de las muestras biológicas se amplifica primero por transcripción inversa (PCR-RT), que provee cantidades suficientes de copias ADN (ADNc), para luego analizarse mediante un complejo juego de técnicas (la técnica más precisa es el clonado molecular de los productos amplificados por PCR-RT, seguido de la secuenciación de las clonas individuales). El grado de heterogeneidad genética de las cuasiespecies del VHC puede estudiarse en dos niveles: 1) la complejidad genética, definida como el número total de variantes virales presentes al mismo tiempo en una muestra única, y 2) la diversidad genética, definida como la distancia promedio entre las diferentes variantes.¹⁰

Interpretación de resultados

En la *figura 4* se detalla el algoritmo a seguir al realizar pruebas de escrutinio para la determinación de infección de VHC:

A) Anti-VHC positivo:¹² Se define como: 1) prueba anti-VHC positivo y ensayo inmunoblot recombinante (RIBA) o prueba de ácidos nucleicos (NAT) positivo o 2) prueba anti-VHC positivo, NAT negativa, RIBA positiva.¹²

- Un resultado anti-VHC positivo indica infección con VHC pasada o en curso.
 - Un resultado anti-VHC positivo indica infección en curso (activa), pero la significancia de un solo resultado anti-VHC negativo es desconocida, no diferencia viremia intermitente de la infección resuelta.¹²

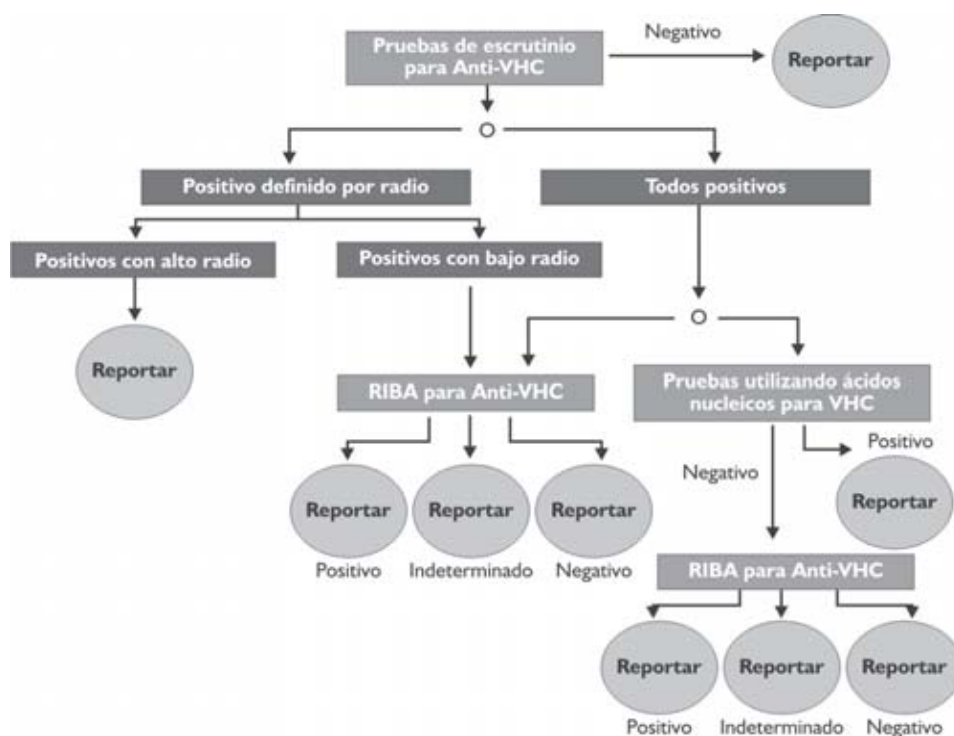


Figura 4. Algoritmo de laboratorio para pruebas y resultados reportados para anticuerpos contra virus de hepatitis C (anti-HCV). Tomado y Modificado de: MMWR Recommendations and Reports CDC: February 7, 2003/ 52(RR03): 1-16.

- Toda persona anti-VHC positiva debe recibir evaluación médica, incluyendo pruebas adicionales que verifiquen la presencia del virus, así como de enfermedad hepática.¹²
 - Usualmente no es necesario repetir después de confirmar un resultado HCV positivo.¹²

B) Anti-VHC negativo:¹² Se define como: 1) prueba anti-VHC negativo; o 2) prueba anti-VHC positivo, RIBA negativa; o 3) prueba anti-VHC positivo, NAT negativa, RIBA negativa.¹²

- Una persona anti-VHC negativo se considera no infectada¹².
- No se requiere evaluación futura o seguimiento para VHC, a menos que se sospeche infección reciente o la existencia de otras evidencias que indiquen infección con VHC (por ejemplo: niveles anormales de enzimas hepáticas en una persona inmunocomprometida o una persona con enfermedad hepática de etiología incierta).¹²

C) Anti-VHC indeterminado:¹² Se define como: anti-VHC positivo, RIBA indeterminado¹².

- Un resultado anti-VHC indeterminado indica que los anticuerpos anti-VHC no pueden ser determinados.¹²
 - Puede indicar un falso positivo del anti-VHC.¹²
 - Puede ocurrir como un hallazgo transitorio en personas recientemente infectadas que están en proceso de seroconversión.¹²
 - Puede ser un hallazgo persistente en personas infectadas de manera crónica con VHC.¹²
- Si NAT no puede ser ejecutado, otra muestra debe ser recolectada para repetir la prueba de anti-VHC (> 1 mes después).¹²

Comentarios finales

Existe una variedad de pruebas diagnósticas disponibles para detectar infección por VHC. EIA y RIBA, son utilizados para identificar individuos con anticuerpos VHC, indicativo de pobre exposición al virus. Detección de ARN de VHC mediante PCR

(o mediante otra técnica de amplificación) determina si el individuo es virémico, indicativo de infección reciente. Desafortunadamente, existen limitaciones para cada una de estas pruebas. Las pruebas para detectar infección con VHC utilizando la determinación de anti-VHC está indicado en: 1) diagnóstico clínico en pacientes con signos y síntomas de enfermedad hepática; 2) manejo en el caso de exposiciones de tipo ocupacional y perinatal; y 3) tamizaje en personas asintomáticas que permita identificar aquéllas infectadas con VHC. Pruebas de anti-VHC también son utilizadas por supervisores de salud pública para monitorear la incidencia y prevalencia con la finalidad de evaluar los esfuerzos de prevención del VHC.^{7,12}

A continuación se detallan las aplicaciones clínicas de las pruebas de laboratorio para detectar VHC:

• **Diagnóstico de hepatitis aguda por VHC:**

Con frecuencia la infección aguda es subclínica, por lo que su diagnóstico representa un desafío, tomando en cuenta que la aparición de anticuerpos es de alrededor de 10 semanas. La técnica de PCR permite detectar el ARN viral en la sangre de un paciente infectado luego de 1-3 semanas de la exposición con el virus. Con las técnicas de EIA de segunda y tercera generación se ha acortado el periodo de ventana de 2-3 semanas. Ante la sospecha clínica de infección aguda por VHC, acompañada de aumento de transaminasas, está indicada la realización de una prueba cualitativa de PCR para la detección del ARN viral. La detección de ARN viral sin la presencia de anti-VHC es un fuerte indicativo de hepatitis C aguda, lo cual puede confirmarse por la subsiguiente seroconversión. Infección aguda con VHC es también infrecuente si están presentes anticuerpos anti-VHC sin presencia de ARN.¹⁰

• **Diagnóstico de hepatitis crónica por VHC:**

Las pruebas de EIA de segunda y tercera gene-

ración (EIA-II? ó EIA-III) constituyen el primer paso en el diagnóstico de hepatitis C. En poblaciones de bajo riesgo con resultados negativos con EIA-II ó EIA-III es suficiente para descartar la infección. Un resultado positivo en este tipo de poblaciones debe confirmarse con pruebas complementarias o cualitativas para la detección del ARN mediante PCR.¹⁰

Un resultado positivo de EIA para VHC es suficiente para confirmar la infección en población de alto riesgo. Sin embargo, la presencia de anticuerpos no permite diferenciar de una infección aguda de una crónica.¹⁰

• **Seguimiento y vigilancia de la respuesta terapéutica:**

La estandarización de las unidades de cuantificación del ARN del VHC posibilita hacer recomendaciones terapéuticas para la hepatitis C crónica. La determinación del genotipo viral antes de iniciar el tratamiento antiviral representa otro de los factores predictivos de respuesta.⁸ La genotipificación deberá realizarse en todos los pacientes con hepatitis C antes de iniciar el tratamiento, para definir la duración y proporcionar información con respecto a la respuesta.¹ En pacientes con infección con el genotipo 1 debe realizarse una nueva determinación cuantitativa 12 semanas después del inicio del tratamiento, para definir si existe respuesta virológica temprana, detectada por la caída en la concentración de ARN viral de por lo menos dos logaritmos o a una concentración indetectable. Esta determinación no es necesaria para los pacientes infectados con los genotipos 2 o 3. El ARN viral deberá determinarse seis meses después del final del tratamiento (24 semanas para los genotipos 2 y 3, y de 48 semanas para el genotipo 1) con la finalidad de valorar si la respuesta virológica es sostenida.¹⁰

• **Diagnóstico de transmisión vertical:** El diagnóstico de infección por VHC en un recién nacido de una madre anti-VHC positiva se establece con la detección del ARN viral mediante PCR.

Puesto que los anticuerpos maternos (IgG) se transfieren en forma pasiva a través de la placenta, pueden permanecer en la sangre del recién nacido por varios meses y hasta un año después del parto, con independencia de si la transmisión vertical del virus ocurrió o no. A pesar de que no hay acuerdo respecto al momento para realizar la determinación del ARN viral en el recién nacido, se aconseja practicar esta prueba entre los seis y 12 meses postparto.⁹

- **Diagnóstico de infección después de una exposición ocupacional:** Se recomienda para el caso de un accidente en el área de la salud con sangre de un paciente infectado por VHC lo siguiente⁹:

- Realizar una prueba de anti-VHC basal y determinar los niveles de ALT.⁹
- Seguimiento mediante anti-VHC (cada 4-6 meses) junto con vigilancia mensual de los niveles de ALT.⁹

El ARN viral se detecta en suero una o dos semanas después de una exposición accidental al VHC. Por tanto, el diagnóstico de hepatitis aguda debe establecerse mediante la detección del ARN del VHC por PCR.⁹

- **Detección del anti-VHC en bancos de sangre:** Una de las mayores limitaciones de las pruebas EIA es el retraso entre la primoinfección y la aparición de anticuerpos contra el VHC detectables. Los equipos con que se cuenta detectan anticuerpos 40-60 días postinfección y 30-40 días después de la aparición del ARN viral circulante.^{9,10}
- **Importancia del estudio de la diversidad y complejidad genética del VHC:** Evidencia acumulada en los últimos años indican que la variación genética es una estrategia importante mediante la cual el VHC puede establecer una infección persistente, evadiendo la respuesta inmunitaria celular o humoral generada por el individuo infectado.^{9,10}
- **Pronóstico de la enfermedad:** Las pruebas virológicas no tienen valor pronóstico. Los

marcadores virológicos (incluidos ARN de VHC y genotipo de VHC) no se correlacionan con la severidad de la lesión hepática o fibrosis, y no deben ser utilizados para predecir el curso natural de la enfermedad o el resultado de la infección o enfermedad extrahepática. Por estas razones, pruebas repetidas de niveles de ARN de VHC no están indicadas como parte del manejo y monitoreo rutinario de los pacientes con hepatitis C.⁹

Referencias

1. Álvarez MH, Pérez CE. Pruebas diagnósticas para hepatitis C. *Med Int Mex* 2004; 20: 368-372.
2. Murphy EL, Bryzman SM, Glynn SA, Ameti DI, Thomson RA, Williams AE, Nass CC, Ownby HE, Schreiber GB, Kong F, Neal KR, Nemo GJ. Risk factors for hepatitis C virus infection in United States blood donors. *Hepatology* 2000; 31: 756-762.
3. Vences AMA, González BF. Diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis C en donadores de sangre. *Rev Mex Patol Clin* 2005; 52 (1): 6-12.
4. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 2001; 345 (1): 41-52.
5. Booth JC, O'Grady J, Neuberger J. Clinical guidelines on the management of hepatitis C. *Gut* 2001; 49 (suppl 1): II-121.
6. Schulze-Krebs A, Premiel D, Popov Y, Bartenschlager R, Lohmann V, Pinzani M, Schuppan D. Hepatitis C virus-replicating hepatocytes induce fibrogenic activation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology* 2005; 129: 246-258.
7. Chapkon MK, Sloan KL, Davison JW, Dufour DR, Bankson DD, Rigsby M, Dominitz JA. Cost effectiveness of testing strategies for chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterology* March 2005; 100 (3): 607-616.
8. Marín y López RA, Romero ES, Infante RL, Méndez AJ, Berrón RP, Morales AN, Vivar R, Carrada E, Rivera RM, Sánchez GS. Hepatitis C seroprevalence in accepted versus deferred blood-donor candidates evaluated by medical history and self-exclusion form. *Transfusion* 2004; 44: 1344-1349.
9. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002; 36: S65-S73.
10. Méndez SN, Uribe EM. Conceptos actuales en Hepatitis C. 2a ed. México: McGraw-Hill, 2005: 85-103.
11. Aguirre GGE, Martínez AJC, Arenas EIA. Resultados en zona gris del tamizaje para VIH y VHC pueden indicar seroconversión inmediata. *Rev Mex Patol Clin* 2005; 52 (1): 63-68.
12. Alter MJ, Kuhmert WL, Finelli L. Guidelines for laboratory testing and result reporting of antibody to hepatitis C virus. *MMWR Recommendations and Reports CDC*: February 7, 2003/52(RR03): 1-16.
13. Wenzel RP. Prevention and control of nosocomial infections. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1997 p. 1187-1227.
14. Dufour DR, Talastas M, Fernández MDA, Harris B, Strader DB, Seeff LB. Low-positive anti-hepatitis C virus enzyme immunoassay results: An important predictor of low likelihood of hepatitis C infection. *Clin Chem* 2003; 49 (3): 479-486.

15. Tobler LH, Tegtmeier G, Stramer SL, Quan S, Dockter J, Giachetti C, Busch MP. Lookback on donors who are repeatedly reactive on first-generation hepatitis C virus assays: justification and rational implementation. *Transfusion* 2000; 40: 15-24.
16. Menitove JE, Richards WA, Destree M. Early US experience with anti-HCV kit in blood donors. *Lancet* 1990; (336): 244-245.
17. Kiely P, Kay D, Parker S, Piscitelli L. The significance of third-generation HCV RIBA-indeterminate, RNA-negative results in voluntary blood donors screened with sequential third-generation immunoassays. *Transfusion* 2004; 44 (3): 349-358.
18. Polywka S, Schröter M et al. Relevance of reactivity in commercially available hepatitis C virus antibody assays. *J Clin Microbiol* 2001; 1665-1668.