

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B: REACTIVIDAD AISLADA DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE

David Navarro Ortega, Ana García Díaz y Nieves Orta Mira

Servicio de Microbiología, Hospital Clínico Universitario de Valencia

El antígeno de superficie (HBsAg) es un complejo proteínico que envuelve la nucleocápside del virus de la hepatitis B (VHB); lo conforman tres proteínas codificadas en el gen *orf S*: una de bajo peso molecular (24-27 kDa), denominada pequeña o mayor (codificada en la región S), esto último por ser la más abundante en el suero de los pacientes infectados, otra de peso molecular intermedio (31 kDa) denominada mediana, codificada en una secuencia que abarca las regiones pre-S2 y S, y una última, la de mayor peso molecular o grande (39 kDa), cuya secuencia codificadora comprende todo el gen S (regiones pre-S1, pre-S2 y S). Los hepatocitos infectados por el VHB producen más HBsAg del necesario para envolver las partículas víricas que se generan en cada ciclo replicativo; el HBsAg excedente, junto con algunas moléculas lipídicas del huésped, se ensambla autónomamente originando partículas no infecciosas que adoptan una conformación circular o tubular; estas últimas pueden ser observadas fácilmente en la sangre de los pacientes infectados aguda o crónicamente por el VHB junto con los viriones infecciosos (partículas de Dane).

La estructura antigénica del HBsAg ha sido dilucidada con precisión: contiene un epítipo conformacional inmunodominante, denominado *a*, y otros dos de especificidades mutuamente excluyentes (*d* o *y/w* o *r*), lo que permite que haya cuatro subtipos de HBsAg: *adw*, *ayw*, *adr*, *ayr*. Existen, además, nueve serotipos conocidos del VHB en virtud de la heterogeneidad antigénica del determinante *w*. Los anticuerpos que reconocen el epítipo *a* protegen al individuo frente a la infección por el VHB al ser capaces de neutralizar el virus circulante. La mayoría de las variedades biológicas del VHB conocidas comparten la secuencia de aminoácidos del determinante antigénico *a*, por lo que los anticuerpos que reconocen este epítipo confieren inmunidad cruzada. No obstante lo anterior, se han descrito cepas portadoras de mutaciones “no conservadoras” en la secuencia del gen S, las llamadas “variantes de escape”, capaces de producir reinfecciones.

DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN POR EL VHB

El diagnóstico de la infección aguda o crónica por el VHB se basa en la detección del HBsAg en el suero o el plasma. El HBsAg es ya detectable en la sangre durante el periodo de incubación de la hepatitis aguda, entre 2-7 semanas antes de que se manifiesten los primeros signos y síntomas de la enfermedad; su aparición en la sangre precede en 2-4 semanas a la elevación de los niveles séricos de las transaminasas. En la mayoría de los casos, el HBsAg continúa siendo detectable durante la fase sintomática de la enfermedad, para dejar de serlo poco después, coincidiendo con la seroconversión de los anticuerpos anti-HBs, ya en la fase de convalecencia (2-3 meses después de la infección). En menos de un 5% de los casos, el HBsAg es eliminado rápidamente de la circulación y no se detecta durante la fase sintomática de la enfermedad.

Un porcentaje de individuos infectados, que varía en función del grupo que se considere, incapaces de eliminar el VHB, desarrolla una infección crónica (persistencia del virus más de seis meses) cuyas consecuencias clínicas pueden ser graves a largo plazo. La presencia del

HBsAg en la sangre indica, pues, que el VHB se está replicando y, por lo tanto, que el paciente es infeccioso; sin embargo, los niveles hemáticos del antígeno e (HBeAg) y del DNA del VHB reflejan mejor que aquél el grado de actividad replicativa del VHB.

Actualmente la detección del HBsAg se lleva a cabo mediante enzimoimmunoanálisis (EIA) comerciales tipo sándwich, los cuales han sustituido al clásico radioinmunoanálisis (RIA); la mayoría de estos ensayos están parcial o completamente automatizados. En estas pruebas el HBsAg contenido en la muestra es fijado a un soporte sólido a través de un anticuerpo frente al HBsAg (anti-HBs), generalmente monoclonal; la presencia del HBsAg se pone de manifiesto mediante el uso de un segundo anticuerpo anti-HBs (anticuerpo revelador), éste de naturaleza monoclonal o policlonal de diferente especie animal de la del captador, marcado con una enzima o con una molécula quimioluminiscente (IQL, ensayo de inmunoquimioluminiscencia).

Los distintos ensayos comerciales que detectan el HBsAg difieren entre sí, esencialmente, en la naturaleza de la fase sólida: micropartículas de poliestireno (MEIA) en las pruebas comercializadas por los Laboratorios Abbott (IMx® y AxSYM®), micropartículas magnéticas (ElecSys®, Roche Diagnostics), pocillos de placas de poliestireno (Organon Teknika, Sorin/Incstar, Ortho Diagnostics, Genetic Systems, etc.) o membranas de nitrocelulosa (ensayos inmunocromatográficos), el tipo de anticuerpo captador: monoclonal (en los ensayos de tercera generación) o policlonal, la dinámica del ensayo: incubación en un solo paso o en dos (primero anticuerpo captador y muestra y después se añade el anticuerpo revelador), la enzima con que está marcado el anticuerpo revelador (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.), o la naturaleza del sustrato: convencional (ELISA) o fluorescente (ELFA).

La extrema sensibilidad de estos ensayos (umbral de detección de 0,25 a 0,5 ng/mL) hace poco probable la posibilidad de falsos negativos; no obstante, se han descrito falsos negativos en portadores crónicos del VHB infectados por cepas de bajo nivel replicativo o por “variantes de escape” que no son reconocidas por los anticuerpos captador y revelador. La especificidad de las pruebas existentes en el mercado no alcanza el 100%. Los falsos positivos son, por lo tanto, una eventualidad de la que ninguna marca comercial está exenta; no obstante, los falsos positivos se confirman o descartan fácilmente con el denominado ensayo de neutralización: se trata de una prueba de confirmación que determina si la reactividad de la muestra se reduce significativamente (al menos un 50%) o desaparece cuando ésta se preincuba con anticuerpos anti-HBs.

La realización de la prueba del HBsAg está justificada en una amplia variedad de situaciones médicas. Entre otras, en el diagnóstico etiológico de las hepatitis agudas y crónicas, y, como prueba de cribado, en la identificación de portadores del VHB en los pacientes que van a ser intervenidos quirúrgicamente, sometidos a endoscopia, hemodializados, trasplantados, o en las gestantes, y en la detección del virus en los preparados de sangre y derivados destinados a transfusiones; no sorprende pues que ésta sea una de las pruebas de mayor uso en el laboratorio de serología y en los bancos de sangre. En algunas de las situaciones enumeradas la petición de la prueba del HBsAg se acompaña de la de otros dos marcadores serológicos de infección por el VHB: los anticuerpos totales frente al antígeno c (anti-HBc) y los anticuerpos frente al HBsAg (anti-HBs); en otras, la petición de estas dos pruebas sigue a la demostración de la presencia del HBsAg en la muestra. Habitualmente, los anticuerpos anti-HBc son detectables cuando se manifiesta clínicamente la enfermedad, coincidiendo con la elevación de las transaminasas, y después perduran incluso en quienes resuelven la infección, y los anticuerpos anti-HBs sólo lo son cuando se elimina el VHB de la circulación sistémica. Por lo tanto, el perfil serológico prototípico del individuo infectado aguda o crónicamente es HBsAg(+), anti-HBc(+) y anti-HBs(-). Mucho menos frecuente es el perfil de marcadores de

hepatitis de la muestra del control de calidad objeto del presente comentario: HBsAg(+), anti-HBc(-) y anti-HBs(-).

PATRONES INFRECIENTES DE REACTIVIDAD SEROLÓGICA DEL HBsAg

La reactividad aislada del HBsAg es, ciertamente, una eventualidad poco frecuente. Puede darse, sin embargo, en las siguientes situaciones:

- a) Fase aguda precoz de una hepatitis B; la confirmación de que éste es el caso se obtiene mediante el ensayo de neutralización antes aludido y demostrando la presencia de anticuerpos séricos IgM anti-HBc o de DNA del VHB en el suero mediante PCR
- b) En pacientes en los que se genera un fenómeno de inmunotolerancia frente al HBsAg; en estos pacientes, sin embargo, se detecta el HBeAg o anticuerpos frente a esta especificidad antigénica (anti-HBe) y el DNA del VHB por PCR, y, por supuesto, la reactividad HBsAg es neutralizable con anticuerpos anti-HBs.
- c) Infección aguda o crónica en pacientes extremadamente inmunodeprimidos; vale para éstos lo dicho en el supuesto anterior.
- d) Infección por variantes defectivas del VHB en el gen X, el cual codifica la proteína transactivadora X cuya intervención es necesaria para la correcta expresión de los genes virales. En estos casos, los niveles séricos del HBsAg son muy bajos (inferiores a 0,5 ng/mL), la reactividad HBsAg es neutralizable y el DNA viral se detecta en el suero mediante PCR. Un caso particular de este supuesto es la infección por las denominadas variantes VHB tipo 2, cuyo análisis escapa del propósito de este comentario.
- e) Vacunación reciente; la antigenemia HBsAg transitoria tras la vacunación con el HBsAg recombinante Engerix® B, fabricado por SmithKline Beecham (Reino Unido), ha sido descrita en donantes de sangre, neonatos y en pacientes incluidos en programas de hemodiálisis. Obviamente, la reactividad HBsAg es neutralizable en estos casos y desaparece una semana después, una vez se elimina la proteína de la circulación sistémica. Excepcionalmente, la duración de la antigenemia HBsAg es de más de una semana, situación que se ha observado en neonatos.
- f) Por último, puede tratarse de una reactividad HBsAg falsamente positiva. Éste es el caso de la muestra del control de calidad que nos ocupa, en donde la falsa reactividad se ha observado que estaba asociada con unos equipos comerciales determinados.

FALSOS POSITIVOS EN LA DETECCIÓN DEL HBsAg

Los fabricantes de las pruebas de detección del HBsAg alertan en la leyenda que acompaña a los reactivos sobre la posibilidad de obtener resultados falsamente positivos cuando se analizan muestras que contienen fibrina, hematíes o un exceso de lípidos; en estos casos, la reactividad HBsAg desaparece cuando las muestras se centrifugan o se mantienen 24-48 h a 4 °C antes de ser analizadas de nuevo. Conviene mencionar que, con mayor frecuencia de la debida, se observan falsos positivos debidos a un lavado insuficiente de la fase sólida del sistema o a la existencia de una contaminación cruzada de muestras. En la mayoría de casos, sin embargo, la causa del falso positivo es ignota.

Los autoanalizadores IMx® y Axsym®, fabricados por los laboratorios Abbott, al igual que los reactivos serológicos que produce esta empresa gozan de buena reputación y gran aceptación en el mercado; prueba de ello es la implantación de estos productos en muchos de los laboratorios de serología y bancos de sangre de nuestro país. La prueba HBsAg (V2), comercializada por Abbott, es un EIA de micropartículas de tercera generación, adaptado para su uso en el Axsym® y en el IMx®, que emplea un anticuerpo monoclonal frente al HBsAg como anticuerpo captador y un anticuerpo policlonal de cabra marcado con biotina como

anticuerpo revelador. La reacción antígeno-anticuerpo se pone de manifiesto añadiendo primeramente un complejo anti-biotina/fosfatasa alcalina y después el sustrato: el 4-metilumbeliferil fosfato; el conjugado cataliza la disociación del grupo fosfato del sustrato generándose así un producto fluorescente que es detectado y cuantificado por el sistema óptico del analizador.

La especificidad de este ensayo, según el fabricante, es del 99,95%. No obstante, en nuestra experiencia, la prueba HBsAg (V2) genera con cierta frecuencia resultados falsamente positivos, particularmente cuando se analizan muestras provenientes de pacientes hemodializados, como la del control de calidad S-1/02. También los hemos observado en muestras de gestantes y de pacientes infectados por el VHC; se trata, en general, de reacciones débilmente positivas (índices-S/CO- comprendidos entre 2-4, siendo 1 el punto de corte) y no neutralizables con anticuerpos anti-HBs; lo habitual es que esas muestras resulten negativas cuando se analizan mediante pruebas comercializadas por otros fabricantes e incluso, curiosamente, mediante otros ensayos producidos por la propia empresa Abbott.

En la leyenda que acompaña al producto HBsAg (V2), la firma Abbott denomina “resultados reactivos inespecíficos” a lo que nosotros hemos llamado aquí “falsos positivos”; de ellos se dice lo siguiente: “las muestras repetidamente reactivas deben ser confirmadas mediante el ensayo de neutralización antes de ser informadas como positivas”. De acuerdo con lo anterior, Abbott no considera falsos positivos de la prueba HBsAg (V2) las reactividades que no se confirman mediante el ensayo de neutralización: nada que objetar. Lo cierto, sin embargo, es que la necesidad de confirmar las muestras débilmente positivas (puesto que las que exhiben un índice S-CO alto no se confirman sistemáticamente en muchos laboratorios, a pesar de la recomendación de Abbott) obliga a utilizar un volumen extra de suero o plasma, no siempre disponible de inmediato, y, en cualquier caso, a demorar la entrega del resultado al clínico. Es difícil imaginar una situación en la que esto último pueda resultar crítico para el paciente, lo que no obsta para que sea un inconveniente que, desde nuestro punto de vista, coloca a Abbott en una situación de desventaja en el mercado en relación con otros fabricantes cuyos productos para la detección del HBsAg no crean el problema aludido.

IMPLICACIONES PARA LAS UNIDADES DE HEMODIÁLISIS

La detección precoz de la infección por el VHB en los pacientes y personal técnico y facultativo es esencial en las unidades de hemodiálisis. Los pacientes infectados activamente por el VHB deben ser dializados en salas distintas de las destinadas a los pacientes no infectados puesto que la segregación de aquéllos, así como del material utilizado para su diálisis, previenen la transmisión interpersonal y yatrogénica del VHB. En ese marco, es crucial que el laboratorio de serología ofrezca a los facultativos responsables de las unidades de diálisis una prueba de detección del HBsAg de sensibilidad y especificidad extremas y de ejecución rápida; dializar a pacientes a quienes creemos infectados por el VHB, sin estarlo (HBsAg falsamente positivos), en una sala de pacientes infectados, o a quienes no creemos infectados, estándolo (falsos negativos), en una dependencia de pacientes no infectados, tendría consecuencias nefastas para los usuarios.

Como ya hemos mencionado, las muestras obtenidas de pacientes sometidos a hemodiálisis son las que generan, en nuestra experiencia, un mayor número de falsos positivos en la prueba HBsAg (V2); algunos de esos especímenes muestran una reactividad HBeAg también falsamente positiva en el ensayo de Abbott. En ocasiones, los positivos espurios de HBsAg y HBeAg que se observan en estos pacientes se deben a la presencia de pequeños e inaparentes coágulos de fibrina en las muestras: los pacientes hemodializados son tratados con

heparina antes de cada sesión de hemodiálisis; las muestras de sangre heparinizadas pueden coagularse parcialmente durante el análisis. Esta reactividad suele ser eliminada añadiendo trombina a la muestra y centrifugando después, o simplemente manteniendo la muestra a 4 °C durante 48 h.; en otros casos, la causa se desconoce, como la muestra del control de calidad objeto de este comentario. Algunas de estas muestras, las menos, son particularmente problemáticas: parecen ser neutralizadas débilmente por los anticuerpos anti-HBs utilizados en la prueba de confirmación (reducción del S-CO relativamente próxima aunque siempre inferior al 50%, valor límite establecido por el fabricante para validar la especificidad de la reacción); en estos casos, aunque lo más probable es que se trate de una neutralización espuria, resulta prudente repetir la prueba con otro suero del paciente, reanalizar la muestra utilizando un prueba de otra casa comercial, e incluso llevar a cabo una PCR de DNA de VHB, lo que genera gastos e incertidumbre.

BIBLIOGRAFÍA

CAMERON SO, STEWART J, DAVIDSON M, HO-YEN D. Problems of an automated testing system for hepatitis B. *Comm Dis Public Health* 2000; 3:141-142.

DIEPERSLOOT RJ, VAN ZANTVLIET Y, GLEAVES C. Comparison of a chemiluminiscent immunoassay with two microparticle enzyme immunoassays for detection of Hepatitis B surface antigen. *Clin Diagnos Lab Immunol* 2000; 7:865-866.

HOLLINGER FB, DIENSTAG JL. Hepatitis B and D viruses. En: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH (eds). *Manual of Clinical Microbiology*, 7ª ed. Washington: ASM Press 1999; pp 1025-1042.

RATNAM S, STEAD F, HEAD CB. False-positive results with third-generation monoclonal hepatitis B surface antigen enzyme immunoassay. *J Clin Microbiol* 1989; 27:2102-2104.

RILEY S, TONG CYW, RUTHERFORD PA. Spurious hepatitis B surface antigen detection in a hemodialysis patient. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13:1898.

SKURRIE IJ, GARLAND SM. False positivity with third generation (monoclonal) assay for hepatitis B surface antigen. *Lancet* 1988; i:299-300.

WEBER B, BAYER A, KIRCH P, SCHLÜTER V, SCHLIEPER D, MELCHIOR W. Improved detection of hepatitis B surface antigen by a new rapid automated assay. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2639-2647.

WREGHITT TG. Blood-borne virus infection in dialysis units-A review. *Rev Med Virol* 1999; 9:183-209.