

La infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) supone un problema de salud pública importante. Aproximadamente, existen en el mundo 350 millones de portadores del virus. En conjunto, la infección es responsable de 1,5 millones de muertes anuales por cirrosis y carcinoma hepatocelular.

Alrededor del 10% de adultos infectados crónicamente por VHB presentan antígenos HBs y HBe y, de éstos, un 20% desarrollan hepatitis crónica activa, con riesgo elevado de aparición de cirrosis, carcinoma hepatocelular o ambos. En un 5-10% de éstos pacientes se produce seroconversión espontánea anti-HBe, mientras que con tratamiento con interferón, la seroconversión se eleva al 30-40%.

En los portadores con anti-HBe, un 3-9% desarrolla hepatitis crónica activa y un 1,5% cirrosis. La desaparición del antígeno HBs del suero de individuos con infección crónica por VHB es un hecho infrecuente. Su incidencia anual es de un 0,4-2% en los países desarrollados, y de un 0,1% y el 0,7% en áreas endémicas, donde la transmisión es, sobre todo, perinatal. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que estos pacientes pueden desarrollar hepatitis B fulminante, cirrosis y carcinoma hepatocelular, por la aparición de mutaciones en el gen X del VHB.

Hoy disponemos de una vacuna segura y eficaz frente al virus. Su utilización en la profilaxis debe reducir las cifras de morbilidad y mortalidad por VHB, habida cuenta que el hombre es el único reservorio importante de la infección.

## ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL GENOMA DEL VHB

El genoma del virus está formado por una molécula de ADN circular, pequeña y parcialmente de doble hélice. La cadena larga, denominada L(-), tiene un tamaño de, aproximadamente, 3,2 Kb, con los extremos 5' y 3' fijos, formando un círculo casi continuo. La cadena corta, o S(+), tiene una longitud variable, pudiendo ser hasta un 50% más corta que la L(-), con un extremo 5' fijo y un extremo 3' libre y variable.

La estructura circular del genoma está asegurada por las regiones de cohesión (220 nucleótidos), situadas en los extremos 5' de cada cadena. En esta región existe una secuencia de 11 nucleótidos que se repite directamente en el otro extremo de la región de cohesión. Estas secuencias repetidas, denominadas DR1 para la situada en la cadena L(-), y DR2 para S(+), se encuentran implicadas en la replicación e integración del genoma del virus en los hepatocitos. En la cadena L (-) se han identificado 4 regiones abiertas de transcripción (ORF), conservadas entre los diferentes subtipos del VHB, que representan genes codificantes. El virus incrementa su capacidad codificante al existir un solapamiento importante entre los distintos ORF. Así, como veremos más adelante, la totalidad del genoma que codifica a Pre-S1, Pre-S2 y al gen S se solapa con la región P, que a su vez solapa parcialmente la región X y al gen C- Pre-C.

### Región env (S - Pre-S)

Codifica las proteínas de envoltura (HBsAg) del virus. El gen S codifica la proteína pequeña SHBS del HBsAg de unos 25 kDa, que representa el componente mayoritario en las envolturas vacías del virus. Ciertas mutaciones puntuales en el gen S modifican el subtipo del VHB. El gen Pre-S2 codifica la proteína mediana MHBS del HBsAg (Gp33/36), la cual juega un papel importante en la unión del virus al receptor hepático, siendo un buen marcador de replicación del virus y, por tanto, de diagnóstico y pronóstico de la infección. Es una proteína muy inmunógena, creando una respuesta de anticuerpos neutralizantes capaces de inhibir la unión del virus al hepatocito. El gen Pre-S1 codifica la proteína mayor LHBS del HBsAg (p39/Gp42). Tanto Pre-S1 como Pre-S2 desarrollan un papel importante en la respuesta inmune frente al VHB, al estimular a los linfocitos Th, originando una respuesta de anticuerpos neutralizantes anti-S.

### Región C, Pre-C

Responsable de la formación del antígeno c (HBcAg) de la nucleocápside y del antígeno e (HBeAg). La región C codifica la proteína de la nucleocápside vírica o *core*, cuyo tamaño molecular es de 22 kDa. Se encuentra unida al retículo endoplasmático del hepatocito, sin ser secretada a la sangre. La transcripción de la región Pre-C y C codifica la síntesis del antígeno e (HBeAg) de 15 kDa, originándose en un primer paso un péptido precursor de unos 25 kDa que, por la acción de proteasas celulares, se escinde para dar la proteína HBeAg que penetra en el retículo endoplasmático celular y es secretado a la sangre.

### Región P

Codifica la polimerasa de ADN del virus, enzima básica de 92 kDa, situada en el interior de la nucleocápside, con actividad de polimerasa dependiente de ARN y ADN. La ADN-polimerasa del VHB presenta en su secuencia de aminoácidos una homología parcial con la transcriptasa inversa de varios retrovirus oncógenos. Está implicada en los mecanismos de transcripción inversa del VHB y de encapsidación del ARN pregenómico.

### Región X

Codifica una proteína x (HBxAg) de 145 aminoácidos que contiene el promotor del gen C. Aunque la función de esta proteína no es bien conocida, se sabe que interviene en la regulación de la expresión del genoma del VHB y, por tanto, regula los mecanismos de transcripción y replicación del virus. El péptido x (HBxAg) es inmunógeno y se detectan anticuerpos frente al mismo en pacientes con hepatitis aguda, crónica o carcinoma hepatocelular, aún en ausencia de otros marcadores de infección por VHB.

### **Subtipos de Antígeno de Superficie (HBsAg)**

Todos los subtipos de HBsAg del VHB poseen un determinante antigénico a que es común para todos pero, además, existen otros dos grupos de determinantes asociados al a y mutuamente excluyentes, el grupo *d/y* y el grupo *w/r*, esto origina los 4 subtipos clásicos del HBsAg: *adw*, *adr*, *ayw*, *ayr*. Se ha descrito la heterogeneidad del determinante antigénico *w*, identificándose 10 distintos subtipos del HBsAg.

## **VARIANTES DEL VHB**

El VHB presenta una elevada variabilidad genómica (10% de su secuencia nucleotídica). Se han descrito mutaciones en todas sus regiones génicas, que afectan no sólo a la evolución clínica de la infección por VHB y a la respuesta terapéutica, sino que tienen consecuencias importantes desde el punto de vista diagnóstico (patrones serológicos atípicos), preventivo (reformulación de la vacuna) y epidemiológico (transmisión vertical/horizontal de las variantes).

### **Variantes defectivas Pre-C**

Carman et al (1989) comunicó el hallazgo de cepas del VHB que presentaban una mutación puntual (codón 1896) en la región Pre-C del genoma que impide la transcripción de las secuencias Pre-C y C, y la síntesis de antígeno HBe. Estudios posteriores demuestran que la mutación Pre-C no es selectiva en cuanto al lugar. Pueden presentarse mutaciones en distintos codones de la secuencia Pre-C con las mismas consecuencias. Además, estas variantes se generan por selección inmunológica en el individuo infectado. Este tipo de variante se detecta, con frecuencia, en los pacientes con hepatitis B crónica activa resistente al tratamiento con interferón, con anticuerpos anti-HBe y bajos niveles de ADN vírico circulante. También se asocia a carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante.

### **Variantes defectivas a (de envoltura o escape)**

Son cepas del VHB incapaces de expresar el determinante antigénico común a del HBsAg, escapando a la respuesta inmune inducida por la vacuna del VHB. Se caracterizan por presentar una mutación en el gen S, que se traduce en cambios en los aminoácidos de la proteína de superficie (HBsAg) que, a su vez, origina una alteración de los epítomos inmunodominantes del determinante a que impide su reconocimiento con anticuerpos monoclonales específicos. Se han descrito variantes de escape por mutaciones en los codones 126, 129, 133, 141, 144 y 145 del gen del HBsAg con fracaso de la inmunoprofilaxis en recién nacidos de madres portadoras HBsAg.

Es posible no diagnosticar la infección por variantes de escape del VHB cuando se utilizan métodos de diagnóstico serológico basados exclusivamente en anticuerpos monoclonales frente al determinante a del HBsAg. Además, la posibilidad de transmisión parenteral/sexual de estas variantes defectivas implica una reformulación de la vacuna que incluya el HBsAg recombinante mutado.

### **Mutaciones en el gen X**

Generalmente localizadas en los codones 130 y 131 del dicho gen, con frecuencia asociadas a mutaciones en la región promotora del core. La infección por cepas VHB con mutaciones en el gen X cursa con ausencia de marcadores serológicos de infección por VHB; se asocia, con frecuencia, a carcinoma hepatocelular y hepatitis fulminante. El diagnóstico requiere siempre técnicas de amplificación genómica de dicho gen (PCR).

### **VHB tipo 2**

Se caracteriza, desde el punto de vista serológico, por reactividad aislada al HBsAg sin seroconversión anti-HBc y ausencia de HBeAg. Transitoriamente, pueden detectarse anticuerpos anti-HBs con niveles bajos de HBsAg y ADN vírico. El diagnóstico de la infección por VHB tipo 2 implica incrementar la sensibilidad de los métodos de detección actuales del HBsAg, mediante ensayos que introduzcan anticuerpos policlonales y monoclonales específicos de la región Pre S-2 de subtipo d, o bien mediante técnicas de PCR del gen S. El origen del tipo 2 del VHB parece estar originado en la aparición de mutaciones en el gen X (regulador de la replicación) que ocasiona que el virus se replique y exprese de forma insuficiente, siendo incapaz de estimular una respuesta inmune adecuada.

### **Variantes del VHB con expresión anómala de los determinantes antigénicos de subtipo**

Originados por mutaciones en el gen S del VHB. Se han descrito dos situaciones: a) coexistencia de determinantes antigénicos mutuamente excluyentes en el suero de un mismo paciente (coinfeción o reinfección por cepas VHB de distinto subtipo), y b) ausencia de expresión de los determinantes de subtipo.

# MARCADORES

Las técnicas serológicas actuales permiten detectar, en los pacientes infectados, los antígenos del VHB y la respuesta de anticuerpos frente dicha infección con distintos grados de sensibilidad y especificidad. Su determinación cualitativa y cuantitativa nos permite realizar un diagnóstico, establecer un pronóstico fiable de la infección, con o sin tratamiento, y conocer la susceptibilidad de la población a la infección por VHB (prevención). Los métodos serológicos utilizados habitualmente en el laboratorio de Microbiología para la determinación de los marcadores de hepatitis B (HBsAg, HBeAg, anti-HBc, anti-HBe, anti-HBs) se basan en la tecnología del inmunoensayo enzimático (EIA), que ha desplazado al radioinmunoensayo (RIA). Suelen utilizarse, sobretodo, técnicas de EIA tipo *sandwich* y EIA competitivo.

## Antígeno de Superficie (HBsAg)

Se produce y se encuentra en el citoplasma del hepatocito y en sangre durante el periodo de incubación, fase aguda de la enfermedad y en el estadio crónico. En portadores altamente virémicos se ha observado que contiene una mayor cantidad de proteína mediana (Gp33/36) y mayor (p39/Gp42) del HBsAg que en los individuos escasamente virémicos. En general, las técnicas de EIA empleadas para el diagnóstico del HBsAg permiten detectar concentraciones de HBsAg entre 0,2-0,5 ng/ml.

En ciertas ocasiones pueden presentarse falsas reacciones positivas al HBsAg (reacciones inespecíficas), que deben confirmarse con la realización de técnicas de neutralización con anti-HBs. Sin embargo, la reactividad aislada para HBsAg puede deberse a otros motivos

- Inmunotolerancia extrema.
- Estadio precoz de la infección aguda por VHB.
- Infección por cepas de VHB defectivas en la expresión del HBxAg, con niveles de ADN vírico detectables solo por PCR.
- Infección por VHB tipo 2; se diagnostican por métodos de EIA que detecten niveles de HBsAg inferiores a 0,4 ng/ml, o bien por técnicas de hibridación (30%) y PCR.

## Antígeno de la cápside (HBcAg)

Este polipéptido propio de la nucleocápside se sintetiza en el núcleo de la célula hepática y no es posible hallarlo aisladamente en el suero del enfermo, sino formando parte de la partícula de Dane. Su poder inmunógeno induce la producción de anticuerpos de las clases IgG e IgM en la infección aguda y crónica por VHB.

## Anticuerpo anti-HBc

Es el primer anticuerpo que aparece en la infección por el virus y persiste años después de la recuperación. La presencia de anticuerpos de la clase IgM frente a éste marcador se interpreta habitualmente como indicador de infección reciente, aunque sabemos que también es detectable en la infección crónica con replicación viral. En ocasiones se detecta en el suero de los pacientes una reactividad aislada para anti-HBc, con ausencia de otros marcadores de infección VHB, lo que puede deberse a:

- Reacción inespecífica ligada a componentes séricos. La especificidad debe confirmarse mediante otra técnica serológica de distinto formato, la detección de anticuerpos anti-HBe o la presencia del ADN vírico.
- Período ventana de la infección VHB.
- Respuesta inmunitaria incompleta al VHB. La presencia aislada de anticuerpos anti-HBc no confiere inmunidad a la reinfección y no constituye, por tanto, un criterio de exclusión para la vacunación.

## Antígeno e (HBeAg)

Detectable en el suero en la fase aguda de la infección y en algunas formas crónicas con actividad. Es un marcador de infectividad y replicación que debe manejarse conjuntamente con los anticuerpos anti-HBe y la detección del ADN viral. Los pacientes con reactividad al HBeAg tienen entre 105-108 Equivalentes de genoma/ml (gE/ml).

## Anticuerpo anti-HBe

Su aparición en el caso de infección aguda indica buena evolución. En general, se detecta antes de que desaparezca el HBsAg y persiste varios años después de la infección. En los casos de infección crónica, en los que coexiste con el HBsAg, suele indicar escasa replicación e infectividad (portador asintomático o hepatitis crónica persistente). Sin embargo, como ya se ha comentado, la seroconversión anti-HBe no siempre indica mejoría, sino que puede deberse a la selección de mutantes Pre-C del VHB, que se asocian a alta replicación vírica con cuadros de hepatitis crónica activa y cirrosis.

## Anticuerpo anti-HBs

Es el último marcador en aparecer, indicando recuperación de la enfermedad, persistiendo durante años. Estos anticuerpos son neutralizantes y confieren protección frente a la infección por VHB. En individuos vacunados es el único marcador que detectamos. Al igual que en el caso del HBsAg, se ha descrito un patrón serológico poco frecuente de reactividad aislada para anti-HBs en individuos no vacunados (0,1%-0,5%), pudiendo deberse a reacciones serológicas inespecíficas, que pueden confirmarse por métodos de neutralización o bien por una respuesta inmunitaria incompleta frente a la infección VHB. Asimismo, se ha documentado la coexistencia de anti-HBs y HBsAg, fundamentalmente en pacientes con hepatitis crónica e individuos de alto riesgo (ADVP). Este patrón de reactividad puede ser debido a:

- Infección por variantes del VHB defectivas de a, o de escape, en sujetos previamente vacunados o en pacientes en

tratamiento con interferón.

- Infección por el VHB tipo 2 en individuos inmunes al VHB.
- Fenómenos de tolerancia inmunológica.
- Administración de gammaglobulina específica a un paciente portador del HBsAg.

La introducción de la vacunación frente al VHB y su monitorización hizo necesario el desarrollo de técnicas serológicas cuantitativas anti-HBs. La mayoría de los métodos inmunoenzimáticos comerciales (Abbott Laboratories; Genetic Systems; Organon Teknika; Ortho Diagnostic Systems; DiaSorin/Incstar, entre otros) incorpora un panel anti-HBs de cuantificación. El panel incluye habitualmente 5 o 6 estándares que contienen una concentración creciente y conocida de un policlonal humano anti-HBs, expresada en mUI/ml. Los resultados de las muestras estudiadas en el mismo ensayo se comparan con los valores de una curva de calibración estándar obtenida a partir del panel de cuantificación.

Títulos superiores a 10 mUI/ml de anti-HBs se consideran protectores; sin embargo, se recomienda la revacunación con títulos anti-HBs comprendidos entre 10 y 100 mUI/ml. Se puede estimar el período de tiempo que dura la protección frente al VHB conociendo el título de anti-HBs tras la última dosis de la vacuna:

- Si es inferior a 100 mUI/ml, la protección es de, aproximadamente, 6 meses.
- Entre 100 y 1000 mUI/ml, la protección es de 2 años.
- Entre 1000 y 10000 mUI/ml, la protección es de 3 a 5 años.
- Cuando el título es superior a 10000 mUI/ml, la protección se prolonga más allá de 6 años.

### **DNA del virus B de la Hepatitis (VHB-DNA)**

Es el marcador más sensible y específico de replicación del VHB. Se detecta en más del 85% de pacientes con HBeAg y se correlaciona de forma directa con el HBcAg hepático. El ADN vírico libre en el suero puede detectarse mediante técnicas comerciales de hibridación (en solución), sensibles y rápidas, ensayos de hibridación del ADN ramificado (Quantiplex, Chiron), con un límite de detección de  $7 \times 10^5$  gE/ml, o por amplificación mediante PCR.

## **BIBLIOGRAFIA**

- Brown JL, Carman WF, Thomas HC. The clinical significance of molecular variations within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1992; 15:144–148.
- Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayannis P, McGarvo MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis infection. *Lancet* 1989; 2:588–591.
- Echevarria JM, León P, Domingo CJ, Lopes JA, Echevarria JE, Contreras G, Fuertes A. Characterization of HBV2-like infections in Spain. *J Med Virol* 1991; 33:240–247.
- Fuertes A, Picazo JJ, Delgado R. Diagnóstico de las hepatitis tipo B. Valor de los marcadores Pre-S2 y anti Pre-S2. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1988; 6:38–43.
- Fukuda A, Ishimura N, Kushiya Y, Moriyama N, Ishihara S, Chowdhury A, Tokuda A, Sakai S, Akagi S, Watanabe M, Fukumoto S. Hepatitis B virus with X gene mutation associated with the majority of serologically "silent" non B, non C chronic hepatitis. *Microbiol Immunol* 1996; 40:481–488.
- Mason A, Lizhe X, Linsheng G, Kuhns M, Perrillo R. Molecular basis for persistent hepatitis B infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology* 1998; 27:1736–1742.
- Waters J, Kennedy M, Voet P. Loss of the common "a" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine induced escape mutant. *J Clin Invest* 1992; 90:2543–2547.
- Zaaijer HL, Ter Borg F, Cuypers HTM, Hermus MH, Lelie PN. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1994; 32:2088–2091.