

Diagnóstico de Hepatitis C

Enrique Ponce de León Chaux*

Resumen

La hepatitis C continúa siendo la mayor causa de hepatitis transmitida en forma parenteral en todo el mundo. Los factores de riesgo para adquirir la infección se han modificado durante los últimos años, dejando de ser la transfusión sanguínea su fuente principal y emergiendo el abuso de drogas endovenosas como la primera fuente de infección por virus C. Es un hecho comprobado que el ser trabajador de la salud aumenta el riesgo de infección con relación a la población general. Últimamente se ha enfocado la investigación al diagnóstico temprano y al tratamiento precoz, lo cual se está logrando con el ingreso de pruebas serológicas y de biología molecular de última generación y la asociación en el tratamiento de Interferón alfa-2b y ribavirina. Aun cuando la vacuna no se obtendrá prontamente hay múltiples grupos trabajando en ella y en ofrecer un tratamiento mejor.

Palabras clave

Hepatitis C, diagnóstico serológico, pruebas moleculares.

INTRODUCCIÓN

El virus de la hepatitis C (HCV) es la principal causa de hepatitis viral crónica. La mayoría de personas con hepatitis C aguda son asintomáticas y menos del 25% buscan atención médica por causa de los síntomas de la enfermedad.

*Médico, Gastroenterólogo, Jefe Gastroenterología, Hepatología y Endoscopia Digestiva, Fundación Cardiovascular del Oriente Colombiano.

Correspondencia: Fundación Cardiovascular del Oriente, Calle 155 A # 23-58, Urbanización El Bosque, Sector E1, Floridablanca, Colombia.

La característica más sobresaliente del virus radica en su capacidad para persistir crónicamente en aproximadamente el 85% de las personas infectadas. La enfermedad cuando se cronifica se caracteriza por su evolución lenta y generalmente asintomática. Cuando se presentan síntomas, éstos son leves e inespecíficos como fatiga, náusea, hiporexia, mialgias, artralgias, escalofrío, pérdida de peso y fiebre. Es fácil entender porqué la detección de hepatitis C aguda es infrecuente. Pero en la segunda y tercera décadas posteriores a la infección, la asociación con morbilidad es clara llegando a ser muy evidente en los pacientes que progresan a cirrosis (hasta el 20%), falla hepática y carcinoma hepatocelular como secuela potencial ^{1, 2, 16, 22-4}.

El HCV es un virus RNA de una sola cadena del tipo de los flavivirus perteneciente a la familia *Togaviridae* se han identificado varios genes estructurales y no estructurales entre las regiones 5' y 3' terminales del genoma viral del HCV (Fig. 1). Las regiones C, E1 y E2 corresponden a genes estructurales que codifican las glicoproteínas de la cápsula y la envoltura viral, mientras que los genes no estructurales -NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B- codifican las enzimas involucradas en la replicación viral.

Se han clasificado 6 genotipos principales y más de 100 subtipos del virus C. En Colombia el genotipo 1 es el más común (80% de los pacientes tipificados).

Revisaremos en este artículo el papel de los exámenes serológicos y de biología molecular comúnmente utilizados en el diagnóstico y monitoreo de tratamiento en los pacientes crónicamente infectados con virus de hepatitis C.

PRUEBAS SEROLÓGICAS PARA EL DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS POR VIRUS C

Actualmente no existen pruebas directas para la detección de los antígenos del HCV. En su lugar los anticuerpos anti-HCV y el ácido ribonucleico (ARN HCV) son los marcadores utilizados para el diagnóstico de la hepatitis C.

Se usan dos categorías principales de test de anticuerpos: Pruebas de tamizaje, diseñadas para alta sensibilidad en la detección de anticuerpos anti-HCV y test suplementarios, originalmente diseñados para ayudar a resolver los resultados falsos positivos de las pruebas de tamizaje.

Los ensayos enzimáticos de inmunoabsorción (ELISA, por sus siglas en inglés) son la elección en el tamizaje para la detección de anticuerpos anti-HCV. Este test tiene grandes ventajas para el diagnóstico incluyendo fácil uso, automaticidad, baja variabilidad y costo moderado. Sin embargo, estas pruebas no son confiables hasta 20 semanas después del contacto y posible infección con el

virus, ni en pacientes cuyo sistema inmune se encuentre comprometido.

El ELISA original anti c100 aparecía en promedio a los 4 - 6 meses después de la infección, podía llegar al extremo de solo positivizarse hasta un año después. Una segunda generación multiantigénica de ELISA (ELISA 2) reemplazó a la primera en 1992. Contiene antígenos del core y de la tercera y cuarta regiones no estructurales del genoma (NS3 y NS4), incorporando el anticuerpo c33 que aparece en promedio a la 11a. semana y siempre antes de la semana 20 del contacto inicial con el virus C.

Una tercera generación de ELISA (ELISA 3) se encuentra en uso para tamizaje de productos sanguíneos en Estados Unidos y en algunos laboratorios en Colombia. El ELISA 3 contiene reconfiguración de los antígenos del core, NS3 y el recién incorporado antígeno de la quinta región no estructural (NS5) del gen (Fig. 1).

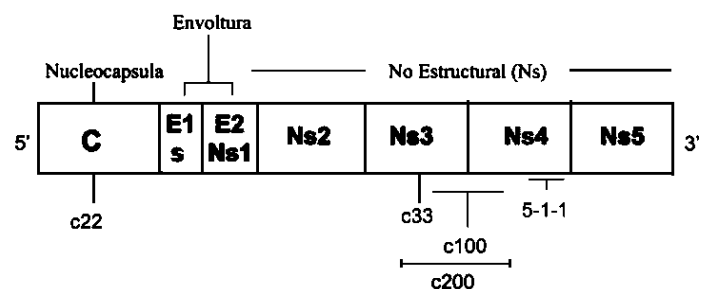


Figura 1. Genoma y Proteínas del Virus C

Una ligera mejoría en la sensibilidad de seroconversión de algunos donantes de sangre se ha reportado comparando el ELISA 3 con el ELISA 2 y el tiempo de seroconversión se ha acortado en 2 a 3 semanas, quedando el tiempo medio de detección de positividad para anticuerpos post-transfusión en 9 a 10 semanas ^{3, 4, 6, 7, 12, 18, 21, 27}.

Contamos también con pruebas recombinantes de inmunoabsorción (RIBA, por su sigla en inglés), con licencia de la FDA clasificándola como prueba suplementaria de identificación de anticuerpos, en especial el RIBA 2, que identifica los mismos antígenos HCV que el ELISA 2 por tanto técnicamente no es una prueba confirmatoria. El resultado de RIBA 2 se interpreta como positivo (dos o más antígenos positivos), indeterminado (un antígeno positivo) o negativo. El RIBA no es más sensible que el test de ELISA correspondiente.

El RIBA 2, sin embargo, puede ser útil para distinguir entre un resultado de ELISA falso positivo y una exposición antigua al HCV, ya que el ELISA falso positivo resulta negativo por el método de RIBA, pero un verdadero positivo por ELISA será RIBA positivo (Tabla 1).

Tabla 1. Pruebas serológicas para Hepatitis C

Pruebas del antígeno	No estructural			
	c 100	5-1-1	c 33	Core
ELISA 1	+	-	-	-
RIBA 2	+	+	-	-
ELISA 2	+	+	+	+

En donantes voluntarios de sangre con baja prevalencia de HCV, los resultados falsos positivos por anti HCV todavía se encuentran por encima del 40% de todos los resultados positivos. A causa de este problema de ELISA falsos positivos en poblaciones de baja prevalencia, se recomienda análisis suplementarios por RIBA para los pacientes ELISA positivo sin factores de riesgo para hepatitis C y para los pacientes ELISA positivos con aminotransferasas normales.

En poblaciones de alta prevalencia con factor de riesgo positivo y/o elevación de aminotransferasas el valor predictivo positivo y la especificidad del ELISA 2 son suficientemente altas (cercasas al 95%) como para excluir la necesidad de prueba de RIBA. En el grupo de baja prevalencia conformado generalmente por donantes voluntarios, sin factores de riesgo y con aminotransferasas normales las pruebas de ELISA 2 - 3 presentan una baja especificidad, cercana al 50%.

Recientemente en Europa se introdujo una tercera generación RIBA 3. Este análisis es ligeramente más específico que el RIBA 2 y tiene mejor correlación con resultados obtenidos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de HCV con un menor número de resultados RIBA indeterminados.

Las pruebas inmunoserológicas tienen múltiples limitantes; podemos contar entre ellas que la presencia de anticuerpos anti-HCV indican exposición previa al HCV, pero no pueden ser considerados como marcadores de infección activa. No se pueden usar los niveles de anticuerpo anti-HCV en la monitoría de respuesta terapéutica. Finalmente en casos de infección aguda por HCV resultante de punción accidental con aguja, muchos pacientes fallan en producir anticuerpos de HCV, siendo imposible diagnosticar la infección por virus C usando técnicas inmunoserológicas ^{4, 12, 13, 16, 21, 27.}

PRUEBAS MOLECULARES PARA DETECTAR ÁCIDOS NUCLEICOS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C

El análisis para la medición del ácido ribonucleico del virus C (ARN HCV) es actualmente el principal marcador de viremia, grado de infectividad y actividad de la enfermedad. Contamos con dos métodos para esto, la

prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés); el método de amplificación de la señal del ADN ramificado (branched DNA = bDNA) es utilizado para detectar el ARN HCV en sangre y tejido.

La PCR es una técnica para amplificación *in vitro* de secuencias específicas de bases de oligonucleótidos del ADN. Se utiliza DNA polimerasa estable al calor para generar un gran número de copias de una porción del genoma viral. La PCR ha probado ser un método, rápido, sensible y útil para la detección de infecciones por virus C.

El bDNA usa el método de amplificación de la señal del ADN ramificado que se utiliza para detectar el ARN HCV en sangre y tejido hepático. Es un ensayo de quimioluminiscencia, basado en una serie de reacciones de hibridación entre muestras específicas de múltiples regiones de la molécula objetivo (HCV ARN) y la subsiguiente amplificación del DNA ^{11, 13, 14, 19.}

Detección cualitativa de ácidos nucleicos del virus C

La PCR se reconoce ampliamente como el método disponible más sensible para detectar la secuencia de ácidos nucleicos del HCV, ofreciendo sensibilidad de 100 moléculas/ ml o menos, bajo condiciones óptimas de laboratorio. Detección de HCV en suero del paciente confirma el diagnóstico de infección activa por HCV, indicando que el paciente está infectado y es infeccioso.

Las pruebas de PCR deben realizarse con extrema precaución previendo contaminación del espécimen durante el proceso del examen, que pudiera llevar a resultados falsos positivos ^{8-10, 14, 30.}

Cuantificación de ácidos nucleicos del virus C

La medición en cantidad de ARN HCV circulante en plasma o suero del paciente es lo que conocemos como determinación de carga viral.

Las pruebas moleculares cuantitativas para determinación de carga viral requieren extracción de ARN HCV del plasma o suero seguida de la amplificación del objetivo o de la señal; aún cuando existe una gran variedad de formas de cuantificar los ácidos nucleicos del virus, solamente discutiremos las dos más usadas:

Prueba de DNA ramificado: bDNA es un test para la cuantificación de niveles de ARN en especímenes clínicos, se basa en amplificar la detección de la señal. La prueba de bDNA de uso corriente en la actualidad es el test de Chiron 2.0 en el cual los títulos de ARN del HCV se reportan en equivalente/ ml. En este test se toman como objetivos la región fija 5' y el core del gen. Detecta los genotipos HCV 1, 2 y 3 con aproximadamente igual eficiencia. La sensibilidad de esta segunda generación del test se

incremento con relación a su antecesor a 200.000 equivalentes/ml.

La prueba de bDNA Chiron 2.0 es excelente para altas cargas vírales (por encima de 10^8 equivalentes/ml) con buena reproducibilidad, lo cual lo hace técnicamente útil para resultados exactos de la viremia previa al tratamiento. Para control de tratamiento, sin embargo, es importante anotar que en especímenes en los cuales el resultado de ARN HCV se encuentre por debajo del límite de detección de Chiron bDNA, se indica repetir la prueba mediante la técnica de RT-PCR (PCR por transcriptasa reversa) la adecuada en pacientes con viremia baja de HCV.

No se usa el bDNA para excluir el diagnóstico hepatitis C activa, por su menor sensibilidad al compararse con RT-PCR que es la prueba de elección en estos casos.

Reacción de polimerasa en cadena por transcripción reversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) en algunos casos es el único método capaz de detectar los ácidos nucleicos vírales y establecer el diagnóstico de infección activa. Recientemente, Roche desarrollo un sistema completamente automatizado (COBAS) Amplicor para la detección por PCR de ARN HCV con sensibilidad del 100%, especificidad del 98%, valor predictivo positivo de 100% y valor predictivo negativo de 97%.

Es de elección en pacientes con viremia baja por HCV; se usa también en el diagnóstico de infección por virus C en recién nacidos de madres infectadas con HCV; para aclarar resultados serológicos indeterminados e identificar infección por HCV en individuos seronegativos de alto riesgo.

La RT-PCR tiene una sensibilidad relativa mayor comparada con el bDNA en el diagnóstico de hepatitis C activa^{8-10, 16, 20, 25, 30}.

UTILIDAD CLÍNICA

Diagnóstico de Hepatitis C

La prueba de ELISA es el examen inicial de tamizaje para determinar infección por HCV. En poblaciones de baja prevalencia, el test de RIBA continúa siendo útil en determinar si un resultado de ELISA es falso positivo o verdadero positivo.

En poblaciones de alta prevalencia, en pacientes con factores de riesgo conocidos para hepatitis C y con elevación de alanina aminotransferasas la prueba de ELISA es suficientemente específica; por tanto, el RIBA complementario es usualmente innecesario. Con este enfoque el HCV ARN es útil determinando cuándo hay replicación activa del HCV (viremia), infección resuelta o inactiva.

Las pruebas óptimas de PCR pueden detectar menos de 100 copias de HCV ARN por ml. en suero o plasma, a pesar de la alta sensibilidad de las pruebas de PCR; en algunos pacientes infectados se pueden encontrar resultados negativos intermitentemente para el virus, en especial durante la fase aguda de la infección.

La detección cualitativa de HCV ARN es importante en el seguimiento de donantes sanguíneos positivos para anticuerpos anti-HCV. En esta población, una prueba positiva para HCV ARN confirma el diagnóstico de hepatitis C activa. En donantes sanguíneos que son HCV ARN negativos, un test suplementario RIBA ayuda a distinguir entre un falso positivo por ELISA (será RIBA negativo) y una infección por HCV antigua resuelta (será RIBA positivo).

En pacientes con hepatitis C aguda la detección del ARN viral en suero es el marcador más temprano. Se puede hacer 1 a 2 semanas post exposición. En bancos de sangre el ideal sería realizar pruebas de HCV ARN pensando en reducir el periodo de ventana entre la infección y la aparición de anticuerpos de respuesta contra el HCV^{1, 8, 16, 18, 26}.

Definición de severidad de la enfermedad

Es claro que la mayoría de pacientes con viremia por virus C tienen enfermedad hepática crónica sin importar los niveles de transaminasas. La histología hepática continua siendo la regla de oro para establecer el grado de compromiso hepático.

Un estudio reciente de Pontiss y col, examina la variación mensual de HCV ARN en 54 pacientes con infección por HCV no tratados, encontrando una significativa variación en la carga viral que no se había observado previamente porque todos los estudios realizan la medición en una sola ocasión. En este estudio los pacientes con grandes picos en la carga viral tenían enfermedad hepática avanzada corroborada por biopsia y niveles de transaminasas mayores que los pacientes con carga viral estable. Estudios posteriores no han podido reproducir este hallazgo^{1, 15-7}.

Predicción de respuesta al tratamiento

Está definido que hay factores del virus que influyen la respuesta al tratamiento y que se pueden determinar previamente a éste; por ejemplo, se ha comprobado por numerosos estudios que el genotipo 1 del HCV tiene una respuesta significativamente menor al tratamiento que la obtenida con pacientes en similares condiciones pero con genotipos 2 o 3.

Adicionalmente una carga viral baja (< de 2 millones de copias/ml) pretratamiento medida en una sola toma se considera un predictor independiente de respuesta sostenida al tratamiento.

Teniendo en cuenta el genotipo y la carga viral se diseña el tratamiento adecuado para cada paciente en particular y su duración ^{5, 10, 16, 17, 19, 25, 28.}

Monitoreo de eficacia del tratamiento

Un gran número de estudios soportan el uso de pruebas de HCV ARN en el monitoreo de la terapia. La recomendación del Instituto Nacional de Salud de Los Estados Unidos por consenso es la toma de ARN HCV a los tres meses de iniciado el tratamiento, continuando la terapia en quienes son HCV ARN (-) y considerar terapias alternativas o interrumpir la terapia en el paciente con HCV ARN (+) a esta altura del tratamiento.

Está comprobada la gran superioridad de la prueba de ácidos nucleicos sobre la medición de niveles de transaminasas, evaluando la respuesta a la monoterapia con interferón alfa 2b, o al tratamiento combinado de interferón alfa 2b y ribavirina.

Las pruebas de ARN HCV en el seguimiento postratamiento han demostrado ser útiles prediciendo la duración de la respuesta sostenida al tratamiento. Vigilancia a largo plazo de 80 pacientes con respuesta virológica sostenida en un estudio mostró que más del 90% mantienen niveles de transaminasas normales y fueron negativos para ARN HCV por 1 a 7 años de seguimiento. Estos resultados se corroboraron con múltiples estudios adicionales que evidencian HCV ARN (-) 6 meses después de terminar la terapia con interferón, lo cual es altamente predictivo de la respuesta a largo plazo a la terapia sin importar los valores de transaminasas.

Marcellin y col reportaron mejoría histológica en más del 90% de los pacientes tratados con interferón con respuesta sostenida. Sin embargo es incierto si hay "curación virológica" en pacientes con eliminación prolongada de ARN HCV del suero. En teoría los pacientes infectados pueden tener reservorios extrahepáticos de virus latentes o inactivos. ^{5, 15, 17-20, 25, 28}

SUMMARY

The hepatitis C is still the major cause of hepatitis transmitted parenterally all over the world. The risk factors to get the infection has been modified during the last years, being the intravenous drug abuse the main cause of the infection by the C virus and leaving the blood transfusion as a secondary source of the disease. It is a fact that the health worker increase the risk of infection compared with the rest of the population. Later on, the investigation has been focused in the early diagnosis and treatment, which has been reached with the serologic tests and the last generation of molecular biology associated to the treatment with alfa-2b interferon and ribavirin. Although the vaccine is not yet developed, multiple groups of investigation are working on it and to offer a better treatment.

Key words: Hepatitis C, serologic diagnostic, molecular tests.

BIBLIOGRAFÍA

- Alter H. Natural history and clinical aspects of hepatitis C virus infection. In Schinazi Sommadossi. Therapies for viral hepatitis. International Medical Press, 1 ed. 1998: 43-50.
- Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, et al. The natural history of community-acquired hepatitis C in the U.S. N Engl J Med 1992; 327:1899-905.
- Barrera J, Francis B, Ercilla G, et al. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. Vox Sang 1995; 68:15-8.
- Berger A, Doerr HW, Preiser W, et al. Lack of correlation between different hepatitis C virus screening and confirmatory assays. J Virol Methods 1996; 59:141-146.
- Brouwer JT, Nevens F, Kleter B, et al. Efficacy of interferon dose and prediction of response in chronic hepatitis C: Benelux study in 336 patients. Hepatology 1998; 28:951-9.
- Bush MP, Tobler LH, Francis B, et al. Reinstatement of donors who test false-positive in second generation hepatitis C virus enzyme immunoassay should await availability of licensed third-generation tests. Transfusion 1994; 34: 278.
- Courouce AM, Bouchardeau F, Girault A, et al. Significance of NS3 and NS5 antigens in screening for HCV antibody. Lancet 1994; 343: 853.
- Farci P, Alter HJ, Wong D, et al. A long-term study of hepatitis C virus replication in non-A, non-B hepatitis. N Engl J Med 1991; 325: 98.
- Fang JWS, Albrecht JK, Jacobs S, et al. Quantification of serum hepatitis C virus RNA. Hepatology 1999; 29:997-8.
- Gretch D, Corey L, Wilson J, et al. Assessment of hepatitis C virus RNA levels by quantitative competitive RNA polymerase chain reaction: High-titer viremia correlates with advanced stage of disease. J Infect Dis 1994; 169:1219-25.
- Hu KQ, Vierling JM. Molecular diagnostic techniques for viral hepatitis. Gastroenterol Clin North Am 1994; 23:479-98.
- Kao JH, Lai M-Y, Hwang Y-T, et al. Chronic hepatitis C without anti-hepatitis C antibodies by second-generation assay. A clinic pathologic study and demonstration of the usefulness of a third-generation assay. Dig Dis Sci 1996; 41:161-5.
- Krarp HB, Jacobsen SE, Varming K, et al. Performance of hepatitis C virus (HCV) antibody test systems in relation to HCV-RNA detection in the diagnosis of HCV infection. Dan Med Bull 1998; 45:89-91.
- Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. Nature 1989; 339:237-8.
- Marcellin P, Boyer N, Gervais A, et al. Long-term histologic improvement and loss of detectable intrahepatic HCV RNA in patients with chronic hepatitis C and sustained response to interferon-alpha therapy. Ann Intern Med 1997; 127:875-81.
- Morishima C, Gretch DR. Clinical use of hepatitis C virus tests for diagnosis and monitoring during therapy. Clin Liv Dis 1999. 3 (4):717-40.
- Naito M, Hayashi N, Hagiwara H, et al. Serum hepatitis C virus RNA quantity and histological features of hepatitis C virus carriers with persistently normal ALT levels. Hepatology 1994; 19:871-5.
- National Institutes of Health Consensus Development Conference panel statement: Management of hepatitis C. Hepatology 1997; 26:2S-10S.
- Neuman AU, Lam NP, Dahari H, et al. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. Science 1998; 282:103-7.
- Pawlotsky J. Measuring hepatitis C viremia in clinical samples: Can we trust the assays? Hepatology 1997; 26:1-5.
- Pawlotsky JM, Lonjon Y, Hezode C, et al. What strategy should be used for diagnosis of hepatitis C virus infection in clinical laboratories? Hepatology 1998; 27:177-82.
- Poynard T, Bedossa P, Opoler P. Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. Lancet 1997; 349:825-32.
- Sherlock S. Viral hepatitis C. Curr Opin Gastroenterol 1993; 9:341-8.
- Tong MJ, El-Farra NS, Reikes AR, et al. Clinical outcomes after transfusion-associated hepatitis C. N Engl J Med 1995; 332:1463-6.
- Trabaud MA, Bailly F, Si-Ahmed SN, et al. Comparison of HCV RNA assays for the detection and quantification of hepatitis C virus RNA levels in serum of patients with chronic hepatitis C treated with interferon. J Med Virol 1997; 52:105-12.
- Van der Poel CL, Cuyppers HTM, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. Lancet 1994; 344:1475.
- Uytdaede S, Claeys H, Mertens W, et al. Evaluation of third-generation screening and confirmatory assays for HCV antibodies. Vox Sang 1994; 66:122-9.
- Walsh KM, Good T, Cameron S, et al. Viral Kinetics can predict early response to alpha-interferon in chronic hepatitis C. Liver 1998; 18:191-5.
- Younossi Z, Mc Hutchinson J. Serological test for HCV infection. Viral Hepatitis Rev 1996; 2: 161- 73.
- Zaaijer HL, Vallari DS, Cunningham M, et al. New antigens for detection of hepatitis C virus antibodies. J Med Virol 1994; 44:395-7.