

Virus C. Aspectos virológicos

Jorge E. González, Jorge Quarleri

Acta Gastroenterol Latinoam 2005; 35; Supl N° 1:

El HCV es el único miembro del género Hepacivirus dentro de la familia Flaviviridae. Es un virus envuelto de 55-65 nm de diámetro cuyo genoma está constituido por una única hebra de RNA de polaridad positiva de 9600 nucleótidos (es decir que tiene capacidad de ser traducido, como un RNA mensajero) y que se caracteriza por su alta variabilidad genómica. La organización genómica comprende dos regiones flanqueantes no codificantes altamente conservadas en los extremos 5' (contiene el IRES) y 3' que encierran un único marco de lectura abierto, para las proteínas estructurales (C-E1-E2) –en el extremo 5'– y para las no estructurales (NS2-NS3-NS4-NS5) en el extremo 3'. Las relaciones filogenéticas establecidas a partir del análisis de secuencias genómicas completas o parciales distribuidas alrededor del mundo, permitieron la identificación de seis grupos mayores llamados clados numerados del 1 al 6, los que a su vez –algunos de ellos– incluyen más de un tipo (genotipo) y dentro de estos un largo número de subgrupos (subtipos) identificados como 1a, 1b, 1c, ..., 2a, 2b, 2c, etc. Los clados difieren entre sí entre 31-34% en sus secuencias nucleotídicas, mientras que entre los subtipos alcanza un 20-23%, con importantes diferencias de acuerdo a la región genómica considerada. Los humanos constituyen el único huésped natural del HCV. No se dispone aún de un sistema eficiente para el cultivo celular o modelo animal versátil para estudios de proliferación viral, –importante pilar experimental– de la virología molecular. Esto condiciona el estudio y comprensión de la replicación y persistencia viral, como así también el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos antivirales y vacunas. No obstante, se han desarrollado sistemas alternativos de estudio [cDNA infectivo; expresión de producto subgenómico de proteínas NS (replicones), partículas similar virus (VLP), entre otros] que han permitido un gran avance en el conocimiento de dichos aspectos. Distintos receptores celulares están involucrados en la unión y entrada del virus a la célula hospedadora. Entre ellas, se incluyen CD81 en linfocitos y proteínas de la superficie celular involucradas en la internalización de lipoproteínas –tales como el receptor de LDL y de clase B tipo I– en hepatocitos. Se propuso que mucopolisacáridos con un alto grado de sulfatación (heparan sulfato) podrían servir como sitio inicial

de absorción para el HCV desde los cuales el virus sería transferido a alguno de los receptores antes mencionados, promoviendo la entrada del virus a la célula. El complejo de glicoproteínas de envoltura E1-E2 se encuentra expresado en la superficie de la partícula viral, constituyendo el candidato natural de “ligando” viral para interactuar con los receptores celulares. Tras ello, el virus ingresaría a la célula por un mecanismo de endocitosis mediado por receptores, seguido de eventos de fusión de membranas entre la envoltura viral y cisternas endosómicas en modo pH dependiente. La cápside viral queda desnuda –por mecanismos no dilucidados– tras su liberación en el citoplasma. El genoma viral constituye el templado para la síntesis de sus copias genómicas y, además, es sustrato para la traducción de la poliproteína viral (PPV) que comienza con la interacción del IRES (región 5' NC) con los ribosomas y donde la región 3' NC jugaría un rol regulatorio muy importante. La PPV es procesada *co* y *post*-traducción por proteasas celulares y virales, a partir de lo cual se generan 10 proteínas maduras. C, E1 y E2, son liberadas por la acción de proteasas celulares, encontrándose separadas de las NS por un pequeño polipéptido de membrana llamado p7, postulado como “viroporina”, o canal iónico implicado en la liberación y maduración de la progenie viral. La asociación del core (C) maduro con las moléculas de RNA genómico neosintetizadas dará origen a las nucleocápsides nacientes del HCV. Experimentalmente se atribuye a la proteína C del HCV un rol crucial en la patogénesis de la enfermedad hepática por su rol modulador en la transcripción de genes celulares, en la proliferación celular, el metabolismo lipídico, la muerte celular y la respuesta inmune. Las proteínas NS2, 3, 4A, 4B, 5A y 5B, se escinden por proteólisis autocatalítica (NS2-NS3) o mediada por la proteasa viral NS3. La estructura tridimensional de ésta fue dilucidada, contribuyendo para el desarrollo de inhibidores específicos de su acción como antivirales. A NS3 se atribuyen, además, funciones de helicasa y NTPasa. Las restantes proteínas NS tienen otras funciones asignadas; entre ellas la NS5B constituye la RNA polimerasa RNA-dependiente viral; NS5A regularía la función de NS5B y se le atribuyen, además, propiedades de incubencia patogénica, tales como inhibición de las acciones antivirales de los in-

terferones (IFNs), activación transcripcional, regulación del crecimiento celular y desencadenamiento de cascadas de señalización intracelular. Las proteínas NS (desde NS3 a NS5B) han sido asociadas a la formación de un complejo de replicación (CR) tras su íntima vinculación con membranas de cisternas celulares (RE y Golgi) en las que se advierte redistribución de lípidos. De este modo dichos CR constituyen sitios de membranas citoplasmáticas enriquecidos en esfingolípidos y colesterol que forman "balsas" lipídicas (rafts) asociados con proteínas virales NS capaces de englobar y proteger el genoma viral, en el que puede llevarse a cabo la replicación del material genómico a manos de NS5B. Para una eficiente y completa liberación por brotación de la progenie viral serían necesarios además de los virales, factores celulares no identificados. La replicación del HCV es extremadamente rápida (~1012 viriones/día), resultando en 106 equivalentes genómicos detectables en suero 1-2 sem post-exposición. Distintos reportes sugieren que el HCV no es citopático *per se*. La esteatosis es la única lesión que puede adjudicarse a la acción directa del virus. Los mecanismos que sostienen la persistencia del HCV *in vivo* son aún ambiguos, e involucran, (i) la evasión a la vigilancia inmune y (ii) la infección extrahepática. Entre los primeros se incluyen las estrategias virales para contrarrestar la acción antiviral de los IFNs (factor 3-regulador del IFN-IRF-3-, la proteín-quinasa RNA dependiente -PKR-, entre otras). El único blanco viral de anticuerpos neutralizantes identificado es la región hipervariable 1 (HVR-1), localizado hacia el extremo amino de E2. Ésta exhibe una alta variabilidad antigénica (cuasi-especies) que contribuye a escapar de la acción de los anticuerpos. Alternativamente, mutaciones en los epitopes reconocidos por células T contribuirían en el mismo sentido. Factores tales como la baja inmunogenicidad del HCV *in vivo* y el efecto inmunosupresor de proteínas virales, favorecen la persistencia. La capacidad para establecer infección en tejidos extrahepáticos -particularmente linfoides- es *per se* otro fenómeno que sostiene la persistencia.

Referencias

- 1- Lindenbach BD and Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields Virology Vol 1, Lippincott Williams and Wilkins 2001;991-1041.
- 2- Op De Beek A et al. Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. J Gen Virol 2001;82:2589-2595.
- 3- Nobuyuki K. Molecular virology of Hepatitis C virus. Review. Acta Med Okayama 2001;55:133-159.
- 4- Roingard P, et al. Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. Biology of the cell 2004;96:103-108.
- 5- Penin F, et al. Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. J Virol 2001;75: 5703-5710.
- 6- Barth H, et al. Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. J Biol Chem 2003;278:41003-41012.
- 7- Agnello V, et al. Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999;96:12766-12771.
- 8- Pileri P, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science 1998; 282:938-941.
- 9- Barth H, et al. Cellular binding of Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface Heparan sulfate. J Biol Chem 2003;278:41003-41012.
- 10- Bartosch B, et al. Cell entry of hepatitis C virus requires a set of coreceptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. J Biol Chem 2003;278:41624-41630.
- 11- Hsu M, et al. Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:7271-7276.
- 12- Lozach PY, et al., DC-SIGN and L-SIGN are high affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2. J Biol Chem 2003; 278:20358-20366.
- 13- Saunier B, et al. Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. J Virol 2003;77:546-559.
- 14- Moradpour D, et al. Insertion of green fluorescent protein into nonstructural protein 5A allows direct visualization of functional hepatitis C virus replication complexes. J Virology 2004;78:7400-7409.
- 15- Aizaki H, et al. Characterization of the Hepatitis C virus RNA replication complex associated with lipids rafts. Virology 2004;324: 450-461.
- 16- Spahn CM, et al. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40S ribosomal subunit. Science 2001; 291:1959-1962.
- 17- Pawlowsky JM, et al. The non-structural 5A protein of hepatitis C virus. J Viral Hepat 1999;6:343-356.
- 18- Egger D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. J Virol 2002;76:5974-5984.
- 19- Thimme R, et al. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:15661-15668.
- 20- Su AI, et al. Genomic analysis of the host response to hepatitis C virus infection. Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:15669-15674.
- 21- Jinushi M, et al. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. J Immunol 2003;170:1249-1256.
- 22- Tseng CT and Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. J Exp Med 2002;195:43-49.
- 23- Crotta S, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. J Exp Med 2002;195:35-41.
- 24- Foy E, et al. Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. Science 2003;300:1145-1148.

- 25- Blindenbacher A, et al. Expression of hepatitis C virus proteins inhibits interferon alpha signaling in the liver of transgenic mice. *Gastroenterology* 2003;124:1465-1475.
- 26- Bertolotti A and Ferrari C. Kinetics of the immune response during HBV and HCV infection. *Hepatology* 2003;38:4-13.
- 27- Lechner F, et al. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000;191:1499-1512.
- 28- Erickson AL, et al. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001;15:883-895.
- 29- Perlemuter G et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J* 2002;16:185-194.
- 30- Serfaty L, et al. Hepatitis C virus induced hypobetalipoproteinemia: a possible mechanism for steatosis in chronic hepatitis C *J Hepatol* 2001;34:428-434.
- 31- Ray RB, et al. Hepatitis C virus core protein promotes immortalization of primary human hepatocytes. *Virology* 2000; 271: 197-204.
- 32- Park JS, et al. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;267:581-587.
- 33- Grakoui A, et al. Bad time for Bonzo? Experimental models of Hepatitis C virus infection, replication and pathogenesis. *Hepatology* 2001;33:489-495.
- 34- Moriya K, et al. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-1067.
- 35- Pietschmann T and Bartenschlager R. Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clin Liver Dis*2003;7:23-43.

Virus C. Aspectos diagnósticos de laboratorio

Fabián F. Fay, Alejandro G. Schijman

Acta Gastroenterol Latinoam 2005; 35; Supl N° 1:

Detección de anticuerpos anti HCV (ELISA)

Consiste en detectar la respuesta inmunológica humoral del paciente infectado contra proteínas virales del HCV mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA). Existen numerosos ensayos comerciales que incluyen como antígenos virales de captura tanto regiones estructurales (core) como no estructurales (NS3, NS4, NS5). Un resultado positivo revela una cicatriz serológica que demuestra el contacto del sistema inmune del paciente con el HCV. Este tipo de análisis es aplicable pasado un cierto tiempo a partir del momento de contacto inicial con el virus, conocido como período de ventana serológico (variable de un paciente a otro, pudiendo ser de 1 a 6 meses). En pacientes infectados inmunosuprimidos (coinfección por HIV, hemodializados) puede no detectarse anticuerpos anti HCV. El informe de este ensayo debe indicar la relación de positividad y los valores de corte (*cut-off*) del mismo, ya que pueden variar en función de cada marca comercial. La determinación de anticuerpos de tipo IgM no se utiliza debido a su baja sensibilidad y especificidad.¹⁻⁴

Detección de anticuerpos anti HCV (RIBA-LIA)

Es un ensayo suplementario al de ELISA que permite discriminar antígenos virales específicos, blancos de la

respuesta inmunológica detectada en el ELISA. Para ello, los antígenos virales son fijados a un soporte (nitrocelulosa-nylon) sobre el cual se capturan los anticuerpos del paciente. Dichos antígenos son de origen recombinante en el RIBA (Recombinant Immuno Blotting Assay) o sintético en el LIA (Linear Immuno Blotting Assay). Los antígenos presentes incluyen regiones estructurales como no estructurales. Su aplicación en la práctica clínica es limitada. Su utilidad consiste en confirmar resultados de ELISA de baja relación de positividad o resultados discordantes ELISA positivos con PCR cualitativa no detectable. Un resultado por RIBA-LIA negativo en pacientes con ELISA positivo indicaría un resultado falso positivo de este último. Por su parte, un resultado RIBA-LIA positivo, con al menos 2 determinaciones de HCV RNA por PCR cualitativa no detectables, sugiere fuertemente que la infección por HCV fue resuelta.²⁻⁵

Detección cualitativa de HCV RNA en suero o plasma

Consiste en determinar la existencia de HCV RNA en suero o plasma (viremia) mediante retrotranscripción de la región 5' no codificante del virus (5' NC), seguida de una amplificación génica por reacción en cadena de la polimerasa anidada (RT-Nested PCR).

Aplicaciones

- Confirmación de replicación viral en pacientes con anticuerpos anti HCV positivo (EIA).
- Definición de infección por HCV en hepatitis agudas durante el período de ventana.
- Definición de infección por HCV en pacientes inmunosuprimidos anti HCV negativos.
- Investigación de transmisión vertical de HCV en hijos de madres seropositivas entre 12 y 18 meses.
- Descarte de sangre y hemoderivados por infección con HCV.

Existen métodos no comerciales (*in house*) y comerciales que utilizan procedimientos manuales o automatizados de RT-PCR o reacciones enzimáticas derivadas conceptualmente de la primera. Es importante destacar que el ensayo sólo arroja resultado Positivo o No detectable. Independientemente del tipo de método, debe informarse la sensibilidad (límite inferior de detección) del ensayo contra un estándar internacional de HCV RNA. La mayoría de los métodos comerciales actuales tienen sensibilidades entre 25 y 50 UI/ml.^{2,3,6,7}

Para el rastreo en bancos de sangre existen métodos especialmente diseñados para este objetivo (Ampli-Screen – Roche; Procleix – Gene Probe) capaces de detectar el HCV RNA en pools de plasma (de no más de 24 muestras) con serología anti HCV negativa, con el objeto de detectar unidades infecciosas en período de ventana.⁴

Determinación del Genotipo de HCV

Consiste en la definición del genotipo del HCV predominante en el paciente infectado utilizando la clasificación de Simmonds.⁸⁻¹¹ Su utilización sólo se aplica a pacientes que serán sometidos a terapia antiviral, dada su utilidad como factor predictivo de respuesta al tratamiento antiviral y para definir el tiempo de duración del mismo.¹²⁻¹⁴ Una vez caracterizado el genotipo, no es necesario volver a realizar esta determinación. Los métodos que pueden utilizarse son: Secuenciación, RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) o LIPA (Linear Inmuno Probe Assay) basados en el análisis de la región 5' NC del virus para la definición del genotipo.¹⁵⁻¹⁹ Todos los métodos descriptos involucran una amplificación previa por PCR por lo que adolecen de efectividad para detectar poblaciones minoritarias, pudiendo determinarse sólo en pacientes HCV RNA positivos por RT-PCR. Sólo detectan infecciones mixtas (más de un genotipo presente) cuando las subpoblaciones, correspondientes a cada uno de ellos superan el 20% de la viremia total (1-4% de los ensayos realizados).

Determinación de Carga Viral de HCV RNA

Consiste en la cuantificación de la cantidad de virus circulante en sangre del paciente infectado. Se utiliza como un factor predictivo de respuesta al tratamiento y como herramienta de evaluación de la cinética de replicación viral intratratamiento.^{4,12-14,20} Sólo son utilizables métodos comerciales validados internacionalmente que ex-

presen sus resultados en UI/ml estandarizados contra el estándar de la Organización Mundial de la Salud.^{21,6} Todos se realizan sobre suero o plasma. En la Argentina se encuentran habilitados por la ANMAT los siguientes métodos:

Método	Rango de medición
Versant Quantiplex HCV-RNA v. 3.0 (Bayer Diagnostics®) (Alter y col, 1995)	615 – 7.700.000 UI/ml
Monitor HCV AmpliCor v. 2.0 (Roche Diagnostics®) (Manual/Cobas) (Colucci y col, 1997)	600 – 800.000 UI/ml
NASBA HCV cuantitativo (Organon Teknika®)(Darnen y col, 1999)	280 – 28.000.000 UI/ml

En el informe debe especificarse el método y el rango activo de medición (límites inferior y superior de detección). La importancia del valor de la carga viral obliga a realizar las diluciones necesarias hasta llegar al valor específico de dicha viremia (no se recomienda expresar los resultados altos de viremia como mayor al límite máximo de detección). Si bien todos los ensayos expresan los resultados en la misma unidad, la comparación entre métodos presenta discrepancias, por lo que se sugiere utilizar siempre el mismo método si se plantea su uso para el monitoreo intratratamiento.⁴

Referencias

1. Carithers RL Jr, Marquardt A, Gretch DR. Diagnostic Testing for Hepatitis C. *Semin Liver Dis* 2000;20:159-171.
2. Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological test for Hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(Suppl 1):S65-S73.
3. Pawlotsky JM, Lonjon I, Hezode C, et al. What strategy should be used for diagnosis Hepatitis C virus infection in clinical laboratories? *Hepatology* 1998;27:1700-1702.
4. Strader DB, Wriugh T, Thomas DL and Seeff LB. Diagnosis, Management and Treatment of Hepatitis C. *Hepatology*, 2004;39: 1147-1171.
5. Hoofnagle JH. Course and outcome of Hepatitis C. *Hepatology* 2002;36(suppl1):S21-S29.
6. Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral Hepatitis. *Gastroenterology* 2003;122:1554-1568.
7. Puoti M, Zonaro A, Ravvaggi A, et al. Hepatitis C Virus RNA and antibody response in the clinical course of acute Hepatitis C virus infection. *Hepatology* 1992;16:877-881.
8. Simmonds P. Viral heterogeneity of the Hepatitis C virus. *J. Hepatol* 1999; 31(suppl 1):54-60.
9. Simmonds P, Smith DB, McOmish F, et al. Identification of genotypes of hepatitis C virus by sequence comparisons in the core, E1 and NS-5 regions. *J Gen Virol* 1994 May;75(Pt 5):1053-61.
10. Quarleri JE, Robertson BH, Mathet VL, et al. Genomic and phylogenetic analysis of hepatitis C virus isolates from argentine patients: a six-year retrospective study. *J Clin Microbiol* 2000;38: 4560-4568.

11. Robertson BH, Myers G, Howards C, et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. Arch Virol 1998;143:2493-2503.
12. Fried MW, Shiffman ML, Reddy KR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. N Engl J Med 2002;347:975-982.
13. Hadziyannis SJ, Sette H, Morgan TR, et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for Chronic Hepatitis C: randomised study of the effect of treatment duration and ribavirin dose. Ann Intern Med 2004;140:346-355.
14. Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of Chronic Hepatitis C: a randomised trial. Lancet 2001;358:958-965.
15. Ansaldi F, Torre F, Bruzzonne BM, et al. Evaluation of a new Hepatitis C virus sequencing assay as a routine method for genotyping. J Med Virol 2001;63:17-1.
16. Blatt LM, Mutchnick MG, Tong MJ et al. Assessment of Hepatitis C virus RNA and genotype from 6807 patients with chronic hepatitis C in the United States. J Viral Hepat 2000;7:196-202.
17. Nolte FS, Green AM, Fiebelkorn KR, et al. Clinical evaluation of two methods for genotyping hepatitis C virus based on the analysis of 5' noncoding region. J Clin Microbiol 2003;41:1558-1564.
18. Ross RS, Viazov SO, Holtzer CD, et al. Genotyping of Hepatitis C virus isolates using CLIP sequencing. J Clin Microbiol 2000;38:3581-3584.
19. Stuyver L, Wyseur A, van Arnhem W, et al. Second generation line probe assays for Hepatitis C virus RNA genotyping. J Clin Microbiol 1996;34:2259-2266.
20. Schijman A, Colina R, Mukomolov S, et al. Comparison of hepatitis C viral loads in patients with or without coinfection with different genotypes. Clin Diagn Lab Immuno. 2004;11:433-435.
21. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Collaborative Study Group. VoxSang 1999;76:149-158.

Métodos diagnósticos y su aplicación clínica

Jorge Findor, Germán Welz

Acta Gastroenterol Latinoam 2005; 35; Supl N° 1:

El laboratorio, junto con las imágenes y la histología, constituye un trípode que, avalado por la clínica, permite definir el diagnóstico y el pronóstico del paciente portador de una hepatopatía por virus C y controlar su respuesta terapéutica.

El laboratorio, a su vez, está conformado por dos grandes grupos: a) el laboratorio bioquímico, mucho más general e inespecífico, y b) el laboratorio virológico.

Las mal llamadas "pruebas funcionales hepáticas" han sido ya ampliamente validadas y no se han producido mayores novedades en el transcurso de los últimos años, salvo algunos hechos que merecen un breve comentario. En primer lugar, se ha revalorizado el empleo de la GGT sobre todo como indicador de una evolución tórpida de la hepatitis C crónica y su deficiente respuesta terapéutica. Una mayor actividad necroinflamatoria y mayor extensión de la fibrosis guardarían cierta relación con mayor elevación de esta enzima, pero su relación con la in-

gesta alcohólica y la esteatosis hepática, ambas frecuentes en la hepatopatía por HCV, le restan especificidad en estas circunstancias. Por otra parte, otros investigadores han evaluado la utilidad de un índice conformado por el nivel sérico de las AST y el número de plaquetas como indicador de extensión de la fibrosis.¹ Otros han propuesto las determinaciones bioquímicas del nivel de gamma globulina, GGT, bilirrubina, beta 2 microglobulina, haptoglobina y apolipoproteína A1, siendo capaces de discriminar correctamente más del 45% de los pacientes en los grupos con fibrosis leve o avanzada.² Este tema ha despertado un gran interés sobre todo por el fracaso del dosaje del procolágeno III y IV, como elemento diagnóstico de fibrosis avanzada. Más recientemente, Sud y col³ han incorporado algunas variantes metabólicas como el antecedente del alcoholismo, aumento de la masa corporal y la determinación de la insulinemia para construir un índice de mayor especificidad y sensibilidad comparada con las

anteriores, lo que permitiría reducir en un porcentaje importante la necesidad de la biopsia hepática. A pesar de que este índice y algunos otros similares se han revelado útiles, por el momento la aspiración de disponer de un marcador bioquímico fidedigno para reemplazar la necesidad de la biopsia hepática con el fin de graduar la extensión de la actividad necro-inflamatoria y de la fibrosis, aún no se ha visto plenamente satisfecha.

El otro aspecto que fue reevaluado es el de las aminotransferasas como marcadores de actividad de la enfermedad hepática. Aunque generalmente el nivel de estas enzimas no guarda una estrecha correlación con el nivel de la lesión hepática, sus niveles normales en infección crónica por el HCV se asocian en rasgos generales, aunque no siempre, a un grado menor de actividad necroinflamatoria y habitual ausencia de fibrosis.⁴ Sin embargo, entre un 5% y un 15% de ellos se puede observar lesiones histopatológicas más o menos avanzadas, lo que llevó a replantearse la necesidad de la biopsia hepática y su indicación terapéutica, concepto éste, actualmente en plena discusión.

El laboratorio virológico, mucho más específico que las pruebas anteriores, ha sido objeto de varias modificaciones metodológicas, lo que ha repercutido en su mayor especificidad y sensibilidad. Las pruebas serológicas con la detección de anticuerpos anti HCV de tercera generación⁵ permite evaluar a aquellos pacientes que en un cuestionario cuidadoso han revelado factores de riesgo para esta infección por el virus C. En USA la drogadicción intravenosa es la causa principal de infección por el HCV y cualquier persona que revela antecedentes de ella debe ser investigada. Igualmente la historia de transfusión de sangre o sus derivados, sobre todo si han ocurrido antes de 1992, también deberían ser investigados. El mismo criterio debe regir en pacientes portadores de hemofilia si han recibido transfusiones o subproductos de sangre antes de 1987, año en que se implementaron los métodos de doble inactivación viral. Otros grupos de alto riesgo representan los enfermos con cirugía cardíaca, hemodializados y aquellos coinfectados con el HIV.⁶ En este grupo alrededor de un 40%, en la Argentina, muestra la presencia de ambos marcadores, nivel que puede ascender hasta un 90% en los drogadictos. La transmisión sexual en parejas monogámicas es baja. En aquellos con pareja múltiple puede ser algo más elevada. El alcoholismo se asocia en un porcentaje variable, entre un 10 y hasta un 30%, con una infección por el HCV. Un grupo especial está representado por aquellos pacientes con elevación leve de las aminotransferasas para determinar su causa. En muchos de ellos el anti HCV puede ser positivo indicando una infección previamente no sospechada.

La primera determinación en la clínica debe ser el anti HCV. Su negatividad, en general, descarta una infección por el virus C, salvo en los grupos de pacientes inmunodeprimidos, en los que esta prueba puede ser negativa a pesar de viremia confirmada por otros medios. En infecciones muy recientes también puede ser negativo el anticuerpo, el que recién se positivizará en alrededor de los 2 meses. Un anticuerpo anti HCV dudoso puede ser reconfirmado por la técnica de RIBA o LIA. El uso de esta última prueba se halla muy restringido en nuestro país por su alto costo y poca sensibilidad.

La biología molecular es la que ha mostrado mayores avances en los últimos años; sobre todo la expresión de la viremia en unidades internacionales ha permitido, de alguna manera, hacer los resultados comparables. También la determinación del HCV RNA cualitativo, más sensible que las determinaciones cuantitativas, puede ser actualmente realizada con tests comerciales, cuyos resultados son más repetibles para certificar la viremia en pacientes anti HCV positivos.

El nivel de la determinación cuantitativa de la viremia, por técnica de biología molecular es menos sensible que la anterior, permite evaluar a pacientes con alta (> 800.000 UI/ml) o baja carga viral. Aunque este dato no tiene importancia en la evaluación general del paciente ya que no correlaciona con la gravedad de la enfermedad ni con el curso natural, adquiere relevancia como factor negativo independiente de respuesta terapéutica.⁷ Por este motivo, la indicación de la determinación de carga viral solamente debe ser solicitada en aquellos pacientes que van a recibir al tratamiento antiviral. En los pacientes con carga viral superior a 800.000 UI/ml deberá solicitarse la realización de diluciones, a fin de seguir mejor el control del tratamiento. El control de la viremia a la duodécima semana de iniciado el tratamiento antiviral en pacientes con genotipo 1 se ha revelado como útil para decidir la continuación o no del mismo. En efecto, la negativización de la carga viral o su reducción en dos logaritmos, se considera un factor predictivo de respuesta sostenida.⁸

La individualización de los genotipos del HCV se ha ido generalizando por su utilidad práctica en el tratamiento. De los 6 tipos mayores, el genotipo 1 es el que predomina ampliamente en nuestro país, aunque en fecha reciente ha aumentado algo el genotipo 3, principalmente en pacientes con antecedentes de drogadicción.⁹ Los genotipos 1 y 4 presentan una mayor resistencia al tratamiento antiviral que los genotipos 2 y 3. También la determinación es útil para definir la duración del tratamiento, ya que la mayoría de los pacientes infectados con el genotipo 2 ó 3, incluso con cirrosis, presentan una respuesta viral sostenida con 6 meses de tratamiento, mientras que en genotipo 1 y 4 la terapia debe extenderse por 12 meses.¹⁰ Su determinación sólo es útil en pacientes que van a ser sometidos a tratamiento, por lo tanto, solamente en esta circunstancia debe ser solicitado. No hay variación del genotipo en el curso de la enfermedad. El genotipo no guarda relación con el curso natural de la enfermedad.

Existe una nueva tecnología basada en la serología para determinar el antígeno core del HCV. Sus niveles correlacionan con aquellas de la viremia cuantitativa por técnica de biología molecular y cada picograma equivale a 8.000 UI/ml. Lamentablemente esta técnica no detecta niveles por debajo de 20.000 UI/ml, lo que restringe su uso clínico.¹¹

La biopsia hepática continúa siendo útil en el manejo del paciente con infección crónica por el HCV a pesar de sus limitaciones y tratarse de un método invasivo,¹² aunque recientemente algunos han discutido su valor en determinados grupos de pacientes, como por ejemplo, en portadores de aminotransferasas normales, en aquellos con genotipo 2 ó 3 en los que la respuesta terapéutica es cercana al 80%, o con evidencias clínicas o imagenológicas de cirrosis. La biopsia provee información sobre el grado de inflamación y fibrosis, datos éstos que tienen valor predictivo sobre la evolución de la enfermedad y la oportunidad de iniciar un tratamiento.¹³

Se han ideado varios *scores* para graduar la necroinflamación y la fibrosis (Ishak, METAVIR). Aunque es indiscutible el valor de la fibrosis como factor negativo en la evolución del paciente y la respuesta terapéutica, se ha prestado menor atención a la relevancia de la necroinflamación como factor pronóstico. En algunos pacientes con ausencia o mínima fibrosis, muchos aconsejan diferir el tratamiento, salvo que presenten manifestaciones extra hepáticas vinculadas a la infección por el HCV. También se suele indicar la biopsia para confirmar o descartar los posibles factores comórbidos que pueden modificar la historia natural de la infección crónica por el HCV, aunque el rendimiento diagnóstico del examen histológico en estas circunstancias es pobre.

Una característica inherente a la infección crónica por el HCV es la presencia de esteatosis hepatocitaria en un alto porcentaje de casos, en especial en los portadores del genotipo 3.¹⁴ En estos pacientes la grasa puede desaparecer con la terapia antiviral, por lo que se considera un efecto citopático del HCV. En los demás genotipos la grasa no guarda una estrecha relación con la infección viral y sí con factores de riesgo tales como obesidad mórbida y diabetes tipo II, y se asocia con una fibrosis más severa.¹⁴

Referencias

1. Wai CT, Grinson JK, Fontana RJ, et al. A simple noninvasive score can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003;38:518-526.
2. Imbert-Bismut F, Ratziu V, Pieroni L, et al. Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C. *Lancet* 2001;357:1069-1075.
3. Sud A, Hui JM, Farrell GC, et al. Improved prediction of fibrosis in chronic hepatitis C using measures of insulin resistance in a probability index. *Hepatology* 2004;39:1239-1247.
4. Shiffman ML, Stewart C, Hofmann CM, et al. Chronic infection with hepatitis C virus in patients with elevated or persistently normal aminotransferase levels; comparison of hepatic histologic in response to interferon therapy. *J Infect Dis* 2000;182:1595-1601.
5. Colin C, Lanoir D, Touzet S, et al. Sensitivity and specificity of third generation hepatitis C virus. *J Viral Hepat* 2001;8:87-95.
6. Thio CL, Nolt KL, Astemborski J, et al. Screening of hepatitis C virus in human immunodeficiency virus infected individuals. *J Clin Microbiol* 2000;38:535-577.
7. Pawlowsky JM. Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* 2003;7:127-137.
8. Davis GL. Monitoring of viral levels during therapy of hepatitis C. *Hepatology* 2002;36:145-151.
9. Findor J, Sordá J, Daruich J, et al. Distribución de genotipos del virus de la hepatitis C en una población de drogadictos endovenosos en Buenos Aires. *Medicina*: 1989;59:49-54
10. Hadziyannis S, Sette H, Morgan TR, et al. Peginterferon- alpha 2 a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose *Ann Int Med* 2004;140:346-355.
11. Bouvier-Alas M, Patel K, Dahari H, et al. Clinical utilities of total HCV-core antigen quantification. *Hepatology*, 2002;36:211-218.
12. Bravo Aa, Sheth S, Chopras, et al. Liver biopsy. *N Engl J Med* 2001;344:495-500.
13. García G, Keeffe E. Liver biopsy in chronic hepatitis C; routine or selective. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3053-3055.
14. Poynard T, Ratziu V, Benmanov Y, et al. Fibrosis in patients with chronic hepatitis C: Detection and significans. *Sem Liver Dis* 2000;20:47-55.
19. Westin J, Norlinder H, Langging M, et al. Steatosis accelerates fibrosis development over time in hepatitis C virus genotype 3 infected patients. *J Hepatol* 2002;37:837-842.