

Curso: El laboratorio en las hepatitis virales

Coordinador: Dr Jorge González

Módulo I: Bioquímica Clínica Dr Gustavo Negri	Página 49
Módulo II: Diagnóstico Viroológico. Serología Dr Jorge Rey	Página 50
Módulo III: Biología Molecular Dra M. Silvina Munné	Página 51
Módulo IV: Epidemiología Tradicional y Molecular Dra Sara Vladimírsky	Página 52

Bioquímica clínica

Gustavo A. Negri

Dpto. Bioquímica Clínica - Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de Buenos Aires

Se consideraran los alcances del laboratorio bioquímico-clínico no especializado en el diagnóstico y control evolutivo de las hepatobiliopatías. Particularmente en las hepatitis virales. No se hará referencia a los marcadores bioquímicos etio-inmunológicos.

Desde hace muchos años se denomina Hepatograma, al conjunto de determinaciones bioquímicas útiles para lo antes expuesto. Si bien el mismo ha variado a lo largo del tiempo, en cuanto a la cantidad y a la calidad de las pruebas que lo componen, actualmente no cumple con los requerimientos necesarios y suficientes. Para establecer claramente los mismos, podemos dividir dicho perfil de determinaciones en función del aspecto que se quiere evaluar, a saber:

- Evaluación del componente inflamatorio y/o necrótico.
- Evaluación del componente colestático.
- Evaluación de la funcionalidad hepática (masa hepática funcionante).
- Evaluación del grado de infiltración linfoplasmocitaria.

Es importante el conocimiento de la genesis y ubicación de las enzimas en el hepatocito (distribución: tisular, celular y subcelular), como así también el conocimiento de la vida media y vías de eliminación de las enzimas implicadas en los procesos metabólicos hepáticos.

Veamos que parámetros se pueden incluir en cada uno de estos ítems:

- Evaluación del componente inflamatorio y/o necrótico:

Aminotransferasas: Alaninoaminoatransferasa (ALT) y Aspartatoaminotransferasa (AST), Sorbitoldehidrogenasa (SDH), Glutamato dehidrogenasa (GLDH), Lacticodehidrogenasa (LDH) e isoenzimas LD-4 y LD-5.

- Evaluación del componente colestático:

Bilirrubina Total y fraccionada, Fosfatasa alcalina (FAL) e isoenzimas: Biliar y Hepática, 5'Nucleotidasa (5'Nu), Gammaglutamiltransferasa (GGT).

- Evaluación de la funcionalidad hepática (masa hepática funcionante).

Seudocolinesterasa (Che), actividad protrombínica, albumina.

- Evaluación del grado de infiltración linfoplasmocitaria.

- Evaluación de la fracción gGlobulínica (eventual cuantificación de las inmunoglobulinas).

En los dos últimos puntos se visualiza la importancia de incluir en un perfil hepático al proteinograma.

Es sumamente importante en el laboratorio bioquímico clínico tener presente los conceptos de calidad total (etapas: preanalítica, analítica y post-analítica). Así, en el tema puntual que estamos tratando es fundamental el manejo del muestreo, utilización de metodologías adecuadas con valores de referencia validados, e interpretación e integración de los resultados obtenidos (informe integrado), lo cual conduce al cumplimiento del objetivo principal que es el logro de un efectivo diagnóstico y seguimiento del paciente.

Diagnóstico virológico. Serología

Jorge Alberto Rey

El uso de marcadores serológicos de los virus de las hepatitis es de suma importancia en el diagnóstico etiológico de las hepatitis virales, agudas y crónicas, debido a que la presentación clínica es indistinguible. Desde fines de los años sesenta el laboratorio cuenta con los primeros marcadores serológicos que permitieron caracterizar etiológicamente las hepatitis virales.

Virus de la Hepatitis B: El descubrimiento del antígeno australiano por Blumberg y la posterior asociación con la transmisión postransfusional del HBV por Prince permitieron caracterizar a los portadores de este virus. El reconocimiento de los otros marcadores del HBV, HBeAg, anti-HBe, anti-HBc IgG e IgM y el anti-HBs, permiten elaborar curvas de evolución de estos marcadores para graficar una hepatitis aguda, una hepatitis crónica, detectar portadores del virus para evitar la transmisión transfusional de hepatitis, y definir pautas de tratamiento hasta la aparición de la biología molecular como herramienta más apropiada para tal fin. Se han utilizado diferentes metodologías para evidenciar la presencia de estos marcadores en el suero de los pacientes. Estas metodologías presentan diferencias en cuanto a sensibilidad, especificidad y facilidad de implementación. A modo de ejemplo, la determinación de HBsAg puede realizarse por diferentes metodologías con sensibilidades que van desde los 0.3 ng/ml hasta los 10 ng/ml. La aparición de mutantes del HBV, puede generar la no detección de portadores del HBsAg así como la no detección del HBeAg en el caso de las mutantes del precore.

Virus de la Hepatitis A: Existen comercialmente pruebas para la detección de anticuerpos anti-HAV de la clase IgM y pruebas que miden la presencia de anticuerpos totales anti-HAV. La aparición de anti-HAV ocurre en el período sintomatológico de la infección dando por lo tanto pruebas reactivas para ambos tests. La positividad para anticuerpos de la clase IgM puede continuar hasta alrededor de los 4 meses de la aparición de los síntomas, aunque en determinados casos puede permanecer detectable por períodos mayores. La detección de anticuerpos anti-HAV de la clase IgG es positiva por toda la vida. El uso de anticuerpos totales anti-HAV es de suma utilidad en estudios epidemiológicos y en la caracterización de poblaciones susceptibles a la infección y candidatas a la vacunación. La positividad para las pruebas de anti-HAV de la clase IgM deben ser interpretadas en un contexto clínico-epidemiológico a los efectos de descartar falsos positivos.

Virus de la Hepatitis D: La infección por HDV ocurre en portadores del HBsAg. El anticuerpo anti-delta es el marcador serológico utilizado para definir inicialmente una hepatitis por este virus y la metodología disponible para tal fin es un ELISA de competición que permite detectar tanto anticuerpos de la clase IgG como IgM. El uso de marcadores del HBV (HBsAg, anti-HBc

y anti-HBc IgM) conjuntamente con la determinación de anticuerpos anti-HDV, permite diferenciar una coinfección de una superinfección por el HDV, aunque hay que destacar que una temprana represión de la replicación del HBV puede disminuir la expresión del HBsAg pudiendo ser negativo este marcador. Existe también ensayos para la detección de anticuerpos de la clase IgM mediante pruebas inmunoenzimáticas de captura m. La presencia de anticuerpos IgM puede persistir en la infección crónica.

Virus de la Hepatitis C: Las pruebas para determinar la presencia de anticuerpos anti-HCV son utilizadas para el definir la infección por el HCV. Históricamente fueron apareciendo pruebas clasificadas por generaciones para la detección de anti-HCV. Estas diferentes generaciones se diferenciaban por la composición antigénica de la fase sólida de los diferentes EIEs. Las pruebas de 3ª generación para anti-HCV incluyen antígenos codificados por la región NS5 lo que permite acortar el período de ventana a alrededor de las 8 semanas. La sensibilidad de estas pruebas es superior al 95% aunque su especificidad depende de la población en estudio. En poblaciones de bajo riesgo esta puede ser de entre el 60 y el 75%. Con la finalidad de disminuir los falsos positivos se han desarrollado pruebas suplementarias como RIBA y LIA. Es necesario destacar que estas últimas pruebas tienen menor sensibilidad que las pruebas de ELISA y por lo tanto no deben ser utilizadas como pruebas iniciales en el diagnóstico, ni tampoco para permitir el ingreso de un individuo ELISA positivo LIA o RIBA negativo al pool de donantes de sangre. La importancia de estas pruebas suplementarias en el contexto clínico puede no ser necesaria en función de los valores de transaminasas o del empleo de pruebas de biología molecular para detectar el ARN viral. Existe además comercialmente un test para antígeno del core de HCV, probablemente disponible este año en Argentina y también para el futuro cercano un test combinado para Ag y anticuerpo. Ambos tests tienen su target en la selección de dadores y como alternativa para este fin de las pruebas de biología molecular.

Virus de la Hepatitis E: El marcador serológico disponible comercialmente para HEV es la determinación de anticuerpos IgG anti-HEV. Las pruebas existentes utilizan como antígeno proteína o péptidos sintéticos codificados por las regiones ORF 2, 3. Los diferentes aislamientos del virus comparten por lo menos un epitope mayor que reacciona cruzadamente. Los tests serológicos para anti-HEV tienen una sensibilidad variable y su especificidad es dependiente de la población en estudio y de la endemidad de la región.

Es posible establecer un panel de marcadores de infección aguda conformado por las determinaciones de HBsAg, anti-HBc IgM, anti-HAV IgM y anti-HCV, aunque de acuerdo a la edad del paciente y a la epidemiología del lugar es posible escalonar o seleccionar estos marcadores para el diagnóstico etiológico de la hepatitis.

Biología molecular

María Silvina Munné

El desarrollo de las técnicas moleculares ha tenido un gran impacto en el campo de la virología y especialmente en las hepatitis virales. No solo han permitido el descubrimiento del virus de hepatitis C (HCV) y la caracterización genómica del virus de hepatitis E (HEV), sino que actualmente son una herramienta indispensable en la práctica clínica para diagnosticar infección activa, ayudar a establecer un pronóstico, guiar decisiones en el tratamiento y determinar la respuesta virológica al mismo en las infecciones crónicas por HCV y virus de hepatitis B (HBV). El screening de sangre a transfundir mediante técnicas moleculares tiende a eliminar el riesgo residual de transmisión de HCV y HBV.

El genoma viral se presenta en cantidades relativamente pequeñas en los fluidos corporales de los pacientes infectados. Por esto su detección y cuantificación requieren un paso de amplificación previa. Esto se logra mediante dos tipos de técnicas, una basada en la amplificación del genoma y otra basada en la amplificación de la señal.

La primera se basa en reacciones cíclicas enzimáticas que generan un gran número de copias de porciones del genoma viral, llamadas amplicones. Los amplicones pueden ser detectados por distintos métodos al final de la reacción y se puede realizar una cuantificación del genoma viral al comparar las señales colorimétricas o quimioluminiscentes con la producida por estándares internos co-amplificados.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utiliza un perfil de distintas temperaturas y una enzima, una DNA polimerasa termoestable. Para los virus RNA se requiere un paso previo de retrotranscripción para generar un DNA copia (cDNA). Los amplicones son DNA doble cadena.

La amplificación también puede ser isotérmica, como sucede en técnicas como el TMA y NASBA, que utilizan más de una enzima. Los amplicones son RNA de simple cadena. Estas técnicas de amplificación del genoma alcanzan una fase de saturación luego de un determinado número de ciclos.

En las técnicas de amplificación de señal, el genoma viral es inmovilizado o capturado con sondas de oligonucleótidos y luego la señal transmitida por los híbridos se amplifica y se detecta.

Cualquier técnica utilizada requiere de una buena calidad de muestra dada por una serie de requisitos en el período pre-analítico en cuanto a obtención, conservación y transporte.

Las técnicas cualitativas pueden ser “caseras” o comerciales y la mayor sensibilidad se logra con técnicas de amplificación del genoma. Las técnicas “caseras” no son recomendadas para un uso generalizado. Estudios con paneles de control de calidad demostraron graves deficien-

cias reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Uno de los mayores problemas son los falsos positivos, especialmente los debido a la contaminación con amplicones de reactivos, superficies, materiales, etc. Para evitarla se requiere respetar rigurosamente precauciones de diversa índole, desde la distribución de áreas de trabajo del laboratorio pre y post amplificación, estrictos hábitos de trabajo, uso de material especial, sistemas decontaminantes, personal entrenado, etc.

Las técnicas comerciales aseguran la estandarización del procedimiento e incluyen controles internos que detectan falsos negativos, por ejemplo los que podrían producirse por inhibición en las reacciones enzimáticas. Hay metodologías que intentan reducir el riesgo de falsos positivos, algunas son de capacidad limitada y no reemplazan las recomendaciones antes mencionadas.

Las técnicas cuantitativas aceptadas son comerciales. Presentan diferencias en el rango dinámico de cuantificación y en el coeficiente de variación intrínseca del método.

Se ha desarrollado la PCR a tiempo real, en la que los procesos de amplificación y detección se producen simultáneamente en un tubo cerrado, sin necesidad de acción posterior, a través de agentes intercalantes o sondas de hibridación específicas. Entre las ventajas demostradas podemos mencionar: resultados más rápidos, evitar riesgos de contaminación, ampliar el rango dinámico de cuantificación.

En el caso de HCV todos los equipos comerciales están referidos a unidades internacionales (IU) de un estándar establecido por la OMS. Esto permite generalizar valores en las recomendaciones derivadas de ensayos clínicos que pueden ser aplicados en la clínica práctica. Sin embargo se recomienda que siempre se comparen valores con el mismo método, ya que existen diferencias intrínsecas entre métodos.

Si bien se dispone de un estándar de la OMS en IU también para HBV todavía los equipos comerciales no refieren sus unidades al mismo.

El análisis de las secuencias del genoma viral permite clasificar filogenéticamente grupos, denominados “genotipos” que a su vez pueden clasificarse en subgenotipos (de importancia clínica en el tratamiento del HCV) y también detectar variantes o mutantes que tienen relevancia clínica (importante en el tratamiento de HBV).

Debido a que no es posible en la práctica obtener la secuencia del genoma viral completo se estudian determinadas regiones genómicas. Si bien la secuenciación directa se considera la técnica de referencia y existen técnicas comerciales que la utilizan, la más ampliamente utilizada se basa en hibridación reversa (LIPA) de los amplicones generados por una técnica de amplificación “casera” con sondas fijas en una fase sólida. También es posible adaptarla al uso de amplicones de técnicas comerciales.

En nuestro país también se acepta en la práctica el uso

de la técnica casera basada en el polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) que consiste en el corte del amplicón por enzimas de restricción originando fragmentos que se visualizan en geles de agarosa o poliacrilamida.

Las técnicas moleculares para el estudio de los virus de hepatitis A no han demostrado ser necesarias para el diagnóstico clínico, ya que se dispone de un marcador serológico confiable. Sin embargo son usadas ampliamente como para HCV y HBV en la epidemiología molecular, en el estudio de la cinética viral, en la investigación de dis-

tintas presentaciones clínicas y en distintos marcos de investigación.

En el diagnóstico de la infección por virus de hepatitis E la detección de viremia y virucopia por técnicas moleculares contribuiría al diagnóstico, ya que no hay disponibles marcadores serológicos adecuados.

En cuanto al virus de hepatitis D, se dispone, a nivel de investigación, de técnicas para determinar viremia, carga viral y genotipo, pero debido a su muy baja endemicidad en nuestro país no han demostrado utilidad clínica.

Epidemiología tradicional y molecular

Sara Vladimírsky

Laboratorio Nacional de Referencia para Hepatitis Virales. INEI – ANLIS “C.G.Malbrán”

Los estudios de laboratorio para los marcadores serológicos de las hepatitis virales se utilizan no sólo para el diagnóstico asistencial o para la investigación clínica. Los resultados de laboratorio son una de las herramientas para la construcción de indicadores que permiten conocer la situación epidemiológica en un tiempo y lugar determinado. Esto es, contribuyen con lo que se conoce como “vigilancia de la salud”.

Las estrategias para realizar la vigilancia de las hepatitis virales son variadas, todas ofrecen información parcializada, de allí la importancia de conocer los alcances y limitaciones de cada una y analizarlas en conjunto para la toma de decisiones adecuadas desde la salud pública.

1.- Vigilancia pasiva: Se basa en las notificaciones de las patologías de notificación obligatoria a través de la denominación planilla C2. Estas se deben elaborar en todos los centros asistenciales públicos y deben ser reportadas a los niveles jurisdiccionales locales, donde son consolidadas y reportadas al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (Si.Na.VE), dependiente del Ministerio de Salud y Acción Social de la Nación. Se notifican: Hepatitis A (HA) y Hepatitis sin Especificar, Hepatitis B (HB) y Hepatitis C (HC) (casos clínicos). Con los casos notificados por las jurisdicciones se construyen las “tasas” (nro de notificaciones /100 000 habitantes) que deberían permitir trazar un perfil de la magnitud de las patologías en todo el país. Una de las falencias del sistema radica en que se basa en la notificación de casos “clínicos”, y la mayoría de las infecciones en HB y HC son asintomáticas. Otra de las limitantes de esta estrategia es la deficiente adhesión de los distintos actores involucrados. De allí que se observan jurisdicciones donde no hay casos notificados para Hepatitis virales por esta vía, cuando sí son detectados por otras estrategias.

2.- Unidades Centinela (UC): Realizan una vigilancia intensificada, en una unidad asistencial particular, con el objetivo de estudiar en profundidad la patología. Carece de denominador poblacional, por lo que no pueden construirse con sus datos “incidencias” (casos nuevos / unidad de tiempo), ni “prevalencias” (casos / unidad poblacional). Pero sí puede monitorear las tendencias en las incidencias y prevalencias cuando disponen de información a través del tiempo. Son sistemas altamente específicos. En nuestro país existe la Red de UC para Hepatitis Virales desde el año 1992. Las UC reportan sus resultados en el marco de reuniones anuales y los resultados se comunican a través de un Informe epidemiológico anual.

3.- Datos de prevalencias en banco de sangre (BS) para las Hepatitis de transmisión parenteral: Se reportan al Centro Nacional de Redes de Laboratorio, de la ANLIS C.G. Malbrán resultados de HBsAg y antiHCV, y en forma creciente, antiHbC, a medida que es incorporada su determinación. Dado el carácter sesgado de la población de donantes de sangre (adultos jóvenes, mayoría de hombres, selección por riesgo) no deben extrapolarse sus resultados a la población general. Dado que en nuestro país todas las jurisdicciones reportan donantes positivos para HB y HC, se constituye en un buen monitor del sistema de vigilancia pasiva.

4.- Investigaciones epidemiológicas: Pueden realizarse: encuestas en población general, encuestas por “demanda espontánea”, estudios en grupos particulares. Proveen una visión de la situación para la patología en estudio en un momento dado en el lugar donde son recogidas.

Las primeras exigen un protocolo de muestreo que garantice calidad de la extrapolación de los datos.

Las encuestas por “demanda espontánea” adolecen del defecto de reclutar a individuos con factores de riesgo para la enfermedad que se estudia.

Los estudios en poblaciones particulares (por ejemplo, individuos con factores de riesgo, donantes de sangre, prequirúrgicos, etc) son la única fuente de datos disponible para Hepatitis E y Hepatitis D en nuestro país, y aportan importantes datos en poblaciones de riesgo para Hepatitis B y C.

De todo lo anterior, se desprende que los resultados del laboratorio serológico son fundamentales para la llamada “epidemiología tradicional”, y, dentro de ella, son fuente de información para la Vigilancia de la salud.

De igual modo la aplicación de las técnicas de biología molecular (BM) en un contexto epidemiológico constituye lo que se conoce como “epidemiología molecular”, Con ella se puede, entre otras: conocer las bases biológicas de los patrones de distribución de las enfermedades, estudiar el origen y propagación de brotes, estudiar factores de riesgo en individuos y caracterizar las interacciones entre huésped y patógenos. La epidemiología molecular contribuye a la epidemiología descriptiva (el estudio de la distribución de la enfermedad en términos de tiempo, lugar y sus consecuencias en la población) ya que permite identificar enfermos en grupos en los que las técnicas convencionales no pueden hacerlo. También contribuye a la epidemiología analítica (el estudio de los factores causales de la enfermedad) ya que permite estudiar a nivel molecular los factores de riesgo. De todas las herramien-

tas de la BM, la secuenciación de ácidos nucleicos a partir de genomas amplificados es una de las más importantes para la obtención de datos con significado epidemiológico para las Hepatitis virales.

Utilizando herramientas informáticas que cuantifican las diferencias en las secuencias nucleotídicas (o en su traducción aminoacídica) mediante complejos algoritmos matemáticos se construyen los llamados “árboles filogenéticos”. Estos árboles filogenéticos permiten inferir relaciones evolutivas entre las secuencias estudiadas y son una de las formas de definir las llamadas variantes genotípicas. Es de interés estudiar las asociaciones de los genotipos, con la distribución geográfica, la evolución de la enfermedad, y, cuando es aplicable, la respuesta a los tratamientos antivirales.

El análisis de secuencias permite también estudiar, además de los genotipos, variantes moleculares en alguna región del genoma que podrían vincularse a formas clínicas particulares de la enfermedad.