

Anomalías y patrones serológicos infrecuentes de los marcadores diagnósticos del virus de la hepatitis B

Isabel García Bermejo

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Getafe. Madrid. España.

El virus de la hepatitis B (VHB) representa un problema de salud pública mundial, a pesar de su mejor conocimiento y de los avances producidos en el diagnóstico, el tratamiento y la prevención. Los marcadores serológicos del VHB constituyen una parte importante de las determinaciones realizadas en el Servicio de Microbiología, debido a su utilidad para efectuar el diagnóstico, conocer la evolución, establecer el pronóstico y realizar los estudios epidemiológicos. En algunas ocasiones, los resultados obtenidos en las pruebas serológicas son difíciles de interpretar. En estas situaciones, las actitudes deben encaminarse a diferenciar las reactividades inespecíficas de las auténticas, verificando la especificidad de los ensayos o comprobando la sensibilidad de la prueba utilizada, repitiendo el ensayo por técnicas o métodos diferentes. En ocasiones, será necesario obtener otra muestra lo antes posible, para analizarla junto con la que presenta el problema o plantearse un seguimiento microbiológico y clínico del paciente. Finalmente, la interpretación de los resultados obtenidos siempre deberá efectuarse junto con la historia clínica del paciente. El objetivo de esta revisión es comentar algunos de los perfiles serológicos infrecuentes o "anómalos" y su posible interpretación según el contexto clínico.

Palabras clave: Serología del VHB. Marcadores del VHB. Virus de la hepatitis B. Variantes del VHB.

Abnormalities and infrequent serological patterns of diagnostic markers of hepatitis B virus

Despite advances in the diagnosis, treatment and prevention of hepatitis B virus (HBV) infection, this disease remains a public health threat worldwide. Consequently, serological markers of HBV constitute a substantial proportion of the total workload performed in microbiology laboratories, because of their utility as tools for diagnosis, monitoring and prognosis and for epidemiological studies. Sometimes, serological test

results are difficult to interpret. In these cases, nonspecific reactivities should be clearly differentiated from true test results to assess the specificity and/or the sensitivity of the assays, either by repeating the tests or by using different techniques or methods. In some instances, drawing a new blood sample as soon as possible can be required. The second sample should be analyzed in parallel with the first specimen to clarify a doubtful initial result or to plan the patient's microbiological and clinical follow-up. Finally, interpretation of the results obtained should always be performed together with evaluation of the patient's clinical history. The present review aims to discuss some infrequent or "anomalous" serological patterns and their possible interpretation according to the clinical context.

Key words: HVB serology. HVB markers. Hepatitis B virus: HBV variants.

Introducción

El virus de la hepatitis B (VHB) representa un problema de salud pública mundial a pesar de la mejora de las condiciones sanitarias, el mejor conocimiento del virus y los avances producidos en el campo del diagnóstico, el tratamiento y la prevención¹. Por ello, es de gran interés establecer un diagnóstico correcto y lo más preciso posible que permita conocer el estadio evolutivo de la infección y la enfermedad para adoptar las decisiones terapéuticas más adecuadas en cada caso, así como establecer las medidas preventivas en la comunidad.

Los marcadores serológicos del VHB son una parte importante de las determinaciones realizadas en el Servicio de Microbiología, debido a su utilidad para efectuar el diagnóstico, conocer la evolución, establecer el pronóstico y realizar los estudios epidemiológicos. La interpretación correcta de estos marcadores no siempre es sencilla, por lo que es conveniente tener presente los patrones serológicos cuyo significado biológico es difícil. El objetivo de esta revisión es comentar algunos de los perfiles serológicos infrecuentes o "anómalos" y su posible interpretación según el contexto clínico.

Consideraciones sobre el virus

El VHB es el prototipo de la familia *Hepadnaviridae*. Su genoma está formado por una molécula circular de ADN

Correspondencia: Dra. I. García Bermejo.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Getafe
Carretera de Toledo, Km 12,500. 28905 Getafe (Madrid). España.
Correo electrónico: ibermejo@efd.net

parcialmente bicatenario y según su organización consta de 4 marcos principales de lectura: C, P, S y X. El primero (C) define 2 regiones: el *pre-core* (pre-C) y el *core* (C), y dirige la síntesis de los antígenos relacionados con el antígeno *core* (HBcAg) y una proteína no estructural que es secretada tras su modificación postraduccional y constituye el denominado antígeno “e” (HBeAg). El segundo (P) dirige la síntesis de la polimerasa viral, poliproteína con actividad ADN polimerasa, transcriptasa inversa y ARNasa. El tercero (S) contiene las secuencias que codifican las 3 glucoproteínas de superficie y presenta 3 señales de iniciación de transcripción, las cuales definen las regiones pre-S1 (proteína L), pre-S2 (proteína M) y S (HBsAg). La región S posee un promotor de transcripción propio que permite a la célula infectada sintetizar y excretar el antígeno de superficie (HBsAg) sin que exista replicación del genoma. Por último, el cuarto (X) consta de una región única, que codifica una proteína no estructural, denominada antígeno X (HBxAg), que interviene en los mecanismos de transcripción y regulación del virus, por lo que es fundamental para la replicación y la proliferación de éste².

El genoma del VHB presenta una tasa de mutación de 1,4-3,2 10^5 sustituciones/nucleótido/año, 100 veces más que otros virus ADN. Debido a ello, el virus circula en forma de una mezcla de variantes genéticas y constituye una cuasiespecie que evoluciona durante la infección. Se han descrito 4 grupos de variantes genéticas que se generan espontáneamente en el curso de una infección natural por el VHB y también por la presión selectiva ejercida por el tratamiento antiviral y la inmunoprofilaxis activa y pasiva. Las variantes mutadas del VHB son seleccionadas debido a que poseen mayor capacidad de supervivencia que los virus no mutados, también denominados cepas salvajes³. La trascendencia clínica de estas variantes es destacable, ya que pueden infectar a individuos vacunados eficazmente o tratados con inmunoglobulinas específicas, producir reinfecciones y ocasionar exacerbaciones o rebrotes en el contexto de una hepatitis B crónica⁴. Desde el punto de vista del diagnóstico microbiológico, es destacable que la infección activa por alguna de estas cepas puede no detectarse por algunas de las pruebas comerciales existentes en el mercado⁵. Estas variantes son las siguientes:

1. Variante de la envoltura viral, gen S, con cambios en el determinante “a” del HBsAg (epítipo inmunodominante), que escapan a la vacunación y a los beneficios de la terapia con inmunoglobulinas específicas (HBIG) frente al virus.
2. Variantes de la polimerasa viral, gen P, que confieren resistencia a los tratamientos con los inhibidores de esa enzima, análogos de nucleótidos/nucleósidos.
3. Variantes de la región *pre-core-core* (pre C-C), que impiden o disminuyen la expresión del HBeAg.
4. Variantes en el gen X, relacionadas con el desarrollo de hepatocarcinoma.

Al margen de estas variantes, existen 9 subtipos del VHB (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+, adrq-) y 8 genotipos (A-H), con una diferencia en las secuencias del genoma viral completo superior al 8%. Los genotipos A y D son ubicuos y el resto presenta una distribución étnica y geográfica característica, y parecen tener diferentes propiedades biológicas que afectan al curso de

la enfermedad, así como a la respuesta a los tratamientos con los antivirales.

La infección y sus fases

El curso clínico de la infección por el VHB es dinámico y está condicionado por la interacción entre la replicación del VHB y la respuesta inmunitaria. Se puede establecer 2 situaciones clínicas bien diferenciadas: la infección aguda y la crónica. La clasificación correcta de las diferentes formas clínicas de la infección es importante para su monitorización y el enfoque terapéutico.

Otra nueva entidad, la denominada “infección oculta del VHB”, engloba una serie de fenómenos y situaciones clínicas distintas que hacen considerar tanto la latencia del virus como la existencia de infecciones persistentes diferentes de las conocidas.

Infección aguda

Se contrae por cualquiera de las vías de transmisión: sexual, perinatal o parenteral. Tras el episodio agudo, la mayoría de los pacientes adultos resuelve la infección, elimina el HBsAg y desarrolla anticuerpos frente al antígeno de superficie (anti-HBs). Sin embargo, en algunos casos la infección persiste y puede hacerse crónica.

Infección crónica

Se caracteriza por la persistencia de HBsAg en suero después de los 6 meses del inicio de la infección, valores de ADN-VHB en suero > 20.000 U/ml ($> 10^5$ copias/ml), elevación de las enzimas hepáticas de forma persistente o intermitente y biopsia hepática que demuestra actividad necroinflamatoria. En la infección crónica se pueden definir 3 cursos evolutivos:

1. Hepatitis crónica HBeAg positivo: producida por la cepa salvaje del VHB, representa la fase inicial de la infección crónica por el VHB. Las concentraciones en suero de ADN-VHB son elevadas.
2. Hepatitis crónica HBeAg negativo con presencia o no de anti-HBe, debida a la existencia de virus mutantes en la región del *pre-core* o en el promotor del *core*. Representa una fase más evolucionada o tardía de la infección por el VHB. Las concentraciones séricas de ADN-VHB suelen ser más bajas y fluctuantes que en los pacientes con hepatitis crónica por VHB y HBeAg positivo.
3. Portador inactivo del VHB, caracterizado por: HBeAg negativo y anticuerpos frente al antígeno e (anti-HBe) positivo, valores de ADN-VHB en suero < 2.000 U/ml ($< 10^4$ copias/ml), alanina aminotransferasa (ALT) con valor normal de forma persistente, y biopsia hepática con actividad necroinflamatoria nula o carente de significado.

Infección oculta del VHB

Cada vez cobra más entidad la denominada hepatitis B oculta. Su existencia justificaría la rápida reaparición del ADN-VHB en el suero al cesar el tratamiento antiviral, la reactivación de la infección en los pacientes inmunodeprimidos con marcadores de inmunidad natural frente al VHB y sin ninguna situación de riesgo que justifique una reinfección exógena, y la infección por el VHB del receptor sin marcadores previos del virus y que recibe un hígado

do de un donante con marcadores serológicos del VHB compatibles con una infección resuelta.

Esta forma de infección se caracteriza por la detección de ADN-VHB en ausencia del HBsAg. Se ha comunicado en pacientes con hepatitis crónica por el VHB y en población sin síntomas de enfermedad hepática como son los donantes de sangre y la población general con las pruebas hepáticas normales^{6,7}. Fundamentalmente, puede encontrarse en 4 situaciones clínicas:

1. Personas aparentemente sanas y con recuperación de la infección por el VHB definida por la presencia de anti-HBs.
2. Hepatitis aguda o crónica producida por una cepa de VHB mutante en el gen S y que no es detectada por los inmunoensayos utilizados para el diagnóstico.
3. Infección crónica por el VHB con presencia de anti-HBc como marcador de la infección y detección paralela de anti-HBe, o en ausencia de este marcador.
4. Personas aparentemente sanas o individuos con hepatitis crónica sin ningún marcador de infección por el VHB, excepto el ADN-VHB.

Una posible explicación a este fenómeno sería el ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), forma en la que el genoma viral permanece en el hepatocito, integrado en el genoma celular a modo de episoma estable y que serviría de molde del ARN pregenómico que posteriormente será transcrito a ADN por la intervención de la transcriptasa inversa, manteniendo así la replicación del virus.

Marcadores virológicos y selección de ensayos virológicos

En la actualidad, se encuentra disponible un número considerable de antígenos virales y sus respectivos anticuerpos, a los que en los últimos años se han sumado los métodos de detección y cuantificación del genoma del VHB (ADN-VHB). En la práctica se utilizan algoritmos diagnósticos⁸.

Los marcadores virológicos se utilizan para efectuar la clasificación y el seguimiento de la infección por el VHB y se pueden diferenciar en:

1. Moléculas proteicas: a su vez, pueden estar codificadas directamente por el VHB, como los antígenos virales, HBsAg y HBeAg, o bien producidas por el hospedador frente a los antígenos virales, en respuesta a la infección, como los anticuerpos anti-HBs (frente al HBsAg), anti-HBc total o de tipo IgM (frente al HBcAg) y anti-HBe (frente al HBeAg). Los antígenos virales y los anticuerpos se detectan mediante enzoinmunoensayos que, generalmente, están automatizados; actualmente muchos de ellos son luminiscentes, con alta sensibilidad y especificidad.
2. Ácido nucleico viral (ADN-VHB): utilizado para la detección del virus, cuantificación (carga viral), estudio de los genotipos y las variantes de los genes P, pre-core y core, así como para cuantificar en el tejido hepático el ADNccc, intermediario principal del ciclo replicativo viral en el interior del hepatocito. La detección y la cuantificación del ADN-VHB se realizan mediante técnicas moleculares; la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es la más utilizada en la práctica diaria.

Anomalías y patrones serológicos infrecuentes de VHB

En el día a día, pueden encontrarse patrones atípicos de los marcadores diagnósticos de la infección por el VHB cuyo significado puede ser difícil de interpretar. Algunos se deberán a problemas técnicos, otros a las limitaciones del método elegido y, en otras ocasiones, pueden deberse a factores biológicos inherentes al paciente o al virus. En muchas ocasiones, será necesario obtener otra muestra lo antes posible para analizarla junto con la que presenta el problema; en otras, además, deberá efectuarse un seguimiento microbiológico y clínico del paciente.

Finalmente, la interpretación de los resultados obtenidos siempre deberá efectuarse junto con la historia clínica del paciente.

No obstante, todavía hoy no existe respuesta para todos los patrones atípicos que se pueden encontrar, pero de algunos de ellos sí se conoce su explicación. A continuación, se relacionan algunos de estos patrones, se comentan los marcadores del VHB complementarios que se recomienda realizar y la explicación posible al patrón serológico encontrado junto con las situaciones clínicas en las que se ha descrito. Por último, en la tabla 1 se efectúa un resumen de todos los patrones comentados.

Detección de ADN-VHB en ausencia de HBsAg

Como es bien sabido, la detección del ADN-VHB indica replicación viral e infectividad. Si se encuentra este patrón en una fase de la infección que no sea la "fase ventana" de una infección aguda, la situación clínica podría definirse como "infección oculta" por el VHB. La detección del ADN viral puede ser aislada o acompañarse de otros marcadores serológicos del VHB. La frecuencia de presentación de este perfil depende de la sensibilidad de las pruebas utilizadas para la detección de ambos marcadores y de la prevalencia de la infección en la población estudiada.

Este patrón se ha encontrado en pacientes con hepatitis crónica por el VHB, carcinoma hepatocelular, portadores inactivos del VHB, pacientes con hepatitis crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), pacientes infectados por el VIH y en donantes de sangre. Este hallazgo preocupa especialmente a los responsables de los bancos de sangre, ya que en la población donante con este perfil no es infrecuente encontrar concentraciones de ADN viral bajas (80-1.000 U/ml), que pueden no detectarse en los estudios de cribado realizados en un *pool* con sangre de diferentes donantes⁶. En la práctica, deberá estudiarse el resto de los marcadores serológicos del VHB, incluido el anti-HBs.

La principal causa de este perfil es la infección, aguda o crónica, por una cepa mutante en el gen S del VHB (mutante de escape). El HBsAg es una proteína inmunológicamente diversa, de la que se han descrito hasta 8 subtipos antigénicos (HBs 1-HBs 8), de los cuales al menos 3 contribuyen al ensamblaje del determinante antigénico "a", común a todas las cepas de VHB. Es el epítipo inmunodominante en el curso de la infección por el VHB y los anticuerpos dirigidos contra él proporcionan la inmunidad

TABLA 1. Patrones serológicos infrecuentes del VHB, marcadores complementarios a realizar, causa posible y contexto clínico en el que se han descrito

Patrón serológico	Marcadores complementarios	Causa posible	Contexto clínico descrito
ADN-VHB (+) HBsAg (-)	• Anti-HBc IgM • Anti-HBc • HBeAg/anti-HBe • Anti-HBs	• VHB mutante (gen S, determinante antigénico "a")	• Infección aguda por el VHB: fase ventana • Infección crónica por el VHB • Infección crónica por el VHC • Carcinoma hepatocelular por el VHB • Portadores inactivos del VHB • Infección por el VIH • Donantes de sangre
HBsAg (+) Anti-HBc (-)	• ADN-VHB • Anti-HBc IgM • HBeAg/anti-HBe	• Reactividad inespecífica del reactivo • Hematíes, fibrina o lípidos en concentración alta • Contaminación de la muestra con el suero de un portador • Contaminación de la muestra con el suero de un portador • Vacunación VHB (21 días previos) • Infección VHB (estadio precoz) • Inmunotolerancia extrema • Infección crónica por VHB mutante (gen X) • Infección por VHB2	• Gestantes • Pacientes hemodializados • Trastornos de la coagulación
Anti-HBc total aislado (HBsAg/antiHBs [-])	• ADN-VHB • HBeAg/anti-HBe	• Reactividad inespecífica de los componentes del suero • Problemas técnicos en la detección del HBsAg: inmunocomplejos, VHB mutante en el gen S • Problemas técnicos en la detección de anti-HBs por sensibilidad baja del ensayo • Coinfección por el VHC • Respuesta inmunitaria incompleta en una infección previa por el VHB • Infección resuelta con pérdida de anti-HBs	• Infección crónica por el VHB • Infección crónica por el VHC • Inmunodeprimidos, incluido el VIH • Personas sanas con exposición previa al VHB
Anti-HBs aislado (no vacunados)	• HBsAg • Anti-HBc total • ADN-VHB opcional	• Reactividad inespecífica • Pérdida anti-HBc (infección pasada) • Respuesta inmunitaria incompleta	• No se asocia a ninguna población determinada
HBsAg (+) Anti-HBs (+)	• ADN-VHB • HBeAg/anti-HBe	• VHB mutante en el gen S • Tratamiento de la hepatitis crónica por el VHB en tratamiento con antivirales y en proceso de seroconversión	• Hepatitis crónica: activa y persistente • Hepatocarcinoma • Reactivación VHB en inmunodeprimidos con marcadores previos de inmunidad • Portadores asintomáticos
Aparición HBsAg con anti-HBs (+) previo	• ADN-VHB	• Reactivación del VHB en inmunodeprimidos en tratamiento con quimioterapia	• Linfoma y leucemia • Cáncer de mama y tumores sólidos • Hepatocarcinoma • Otros tumores

al virus después de la infección natural resuelta o tras la vacunación.

El primer caso de mutación en el determinante "a" fue descrito por Carman et al en 1990, en un niño nacido de madre portadora que había sido vacunado y tratado con HBIG después del parto. Se constató un cambio de glicina

por arginina en el aminoácido 145 (G145R). Desde entonces, se han hallado otras cepas con mutaciones en el gen S, principalmente en niños con infección perinatal y que habían recibido inmunoprofilaxis activa y pasiva, en pacientes con hepatitis B crónica activa en presencia de anticuerpos anti-HBs séricos, en receptores de trasplante

hepático tratados con HBIG y en pacientes sometidos a trasplante hepático o renal, vacunados y con valores séricos de anti-HBs considerados protectores.

Otras mutaciones descritas son: D144A, T126N, G130R, Q129H, M133L. Estudios recientes indican que algunas de estas cepas portan, además, mutaciones en otras regiones de la región S externas al determinante antigénico "a", incluso en la región pre-S2, que también disminuyen la avidéz con que los anticuerpos anti-HBs reconocen el complejo HBsAg mutado. Estas variabilidades genéticas modifican sustancialmente la naturaleza antigénica del HBsAg, tienen repercusión clínica por escapar a la respuesta de los anticuerpos producidos por la vacuna o a la inmunización pasiva, y suponen un reto para los fabricantes de inmunoensayos con fines diagnósticos, ya que no todos los que están comercializados son igualmente eficaces en la detección de ciertos mutantes en el gen S, por lo que es importante elegir el tipo de prueba que se utiliza y conocer sus limitaciones, por si en determinados pacientes y circunstancias clínicas concretas debiera estudiarse la misma muestra con diferentes ensayos, e incluso realizar estudios moleculares^{9,10}.

La existencia de cepas del VHB variantes de escape en el gen S también explica que pueda detectarse ADN-VHB en ausencia de HBsAg y detección simultánea de anti-HBs y anti-HBe. Este supuesto puede ocurrir en las personas inmunizadas con vacuna recombinante e infectadas con una de estas cepas mutantes de escape del VHB, en la reinfección en personas con marcadores previos de inmunidad o mutación del virus durante el proceso de seroconversión en pacientes en tratamiento con antivirales o sin tratamiento.

Reactividad de HBsAg en ausencia de anti-HBc

El HBsAg es el marcador más precoz en la infección aguda por el VHB; es detectable durante el período de incubación de la hepatitis aguda, antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad, y precede en 2-4 semanas a la elevación de los valores séricos de las transaminasas. En la actualidad, la alta sensibilidad de los ensayos utilizados para detectar el HBsAg, la mayor parte de ellos con una sensibilidad inferior a 0,2 ng/ml, hace improbable los resultados falsos negativos, pero la especificidad de las pruebas existentes en el mercado no alcanza el 100%, por lo que en este caso deberá confirmarse el resultado mediante la prueba de neutralización del HBsAg con anticuerpos policlonales o monoclonales específicos frente al antígeno (anti-HBs). También deberá realizarse el estudio de los siguientes marcadores: anti-HBc IgM, HBeAg/anti-HBe y DNA-VHB¹¹. Las explicaciones posibles a este perfil son las siguientes:

1. Reactividad inespecífica en las pruebas sistemáticas de detección del HBsAg. En la mayoría de los casos, la reactividad es débil, hecho que hace dudar de su significado, y la muestra problema no será confirmada por neutralización con el anti-HBs; asimismo, el resto de los marcadores serán negativos, por lo que quedará descartada la infección por el VHB.

Los resultados falsos positivos son una contingencia inherente a cualquier marca comercial, por lo que cada fabricante deberá alertar de las posibilidades de presentación en su ensayo. Una posibilidad es que la reactividad se

deba al tipo de trazadores utilizados para el marcado y el revelado de la reacción, por lo que la repetición de la prueba utilizando otro método diferente puede resolver el problema. En otros casos, y con algunos de los reactivos existentes en el mercado, la presencia de hemáties, fibrina o lípidos en exceso puede producir reactividades inespecíficas, que, por lo general, se solventan volviendo a centrifugar la muestra o refrigerándola a 4 °C durante 24-48 h antes de volver a analizarla por el mismo sistema. En cualquier circunstancia, la neutralización de la muestra con el anti-HBs ayudará a aclarar la situación. Las gestantes, los pacientes hemodializados y los que presentan trastornos en la coagulación son grupos de población en los que con frecuencia se encuentra esta reactividad inespecífica.

En algunas ocasiones será necesario solicitar una segunda muestra extraída con 15-30 días de diferencia respecto a la primera para comprobar si ha desaparecido la reactividad del HBsAg (este supuesto será comentado en el subapartado 7).

2. Contaminación de la muestra con pequeñas cantidades de suero de un portador. Si existe replicación viral en la muestra contaminante, pueden detectarse valores bajos de HBeAg o ADN-VHB. En esta situación, la muestra problema será confirmada al efectuar la prueba de neutralización del HBsAg con el anti-HBs, por lo que sólo la obtención de una nueva muestra y el seguimiento del paciente podrán descartar la infección por el VHB.

3. Vacunación frente al VHB en los 21 días previos al momento de la toma de muestra. Es conocido que la vacuna frente al VHB induce una antigenemia HBsAg transitoria. Este fenómeno se ha encontrado en recién nacidos, adultos sanos y en pacientes sometidos a un programa de hemodiálisis, todos ellos receptores de vacuna recombinante. Generalmente, el HBsAg es detectable entre los días 1-7 posvacunación; sin embargo, en los neonatos se han descrito períodos más largos, de hasta 21 días.

En estos casos, la muestra problema será confirmada al efectuar la prueba de neutralización con el anti-HBs, y el resto de los marcadores serológicos serán negativos; aunque el antecedente de una vacunación reciente resuelve la situación; no obstante, si se desea demostrar la desaparición del HBsAg, puede repetirse la determinación en otra muestra obtenida al mes de la primera y antes de la administración de otra dosis de vacuna, en el caso de que el paciente no hubiera concluido el proceso de inmunización.

Se ha descrito una posible relación entre la aparición transitoria de HBsAg posvacunación y la ausencia de respuesta a la vacuna recombinante. Algunos autores han dado como posible explicación una adsorción incompleta del antígeno al hidróxido de aluminio utilizado como adyuvante, quedando cierta cantidad de antígeno libre capaz de difundir al medio extracelular, lo que conduciría a un fallo en los mecanismos de captación-presentación de antígeno por las células presentadoras y, en consecuencia, a una pobre o nula respuesta a la vacuna.

4. Infección aguda por el VHB en estadio muy precoz. En este caso, generalmente existirá ADN viral y, en la mayoría de las ocasiones, podrá detectarse HBeAg y anti-HBc IgM. El seguimiento del paciente podrá demostrar la aparición del anti-HBc total. Sólo en estadios muy precoces de la infección, y con una probabilidad de presentación muy baja, el HBeAg y el ADN-VHB serán negativos.

5. Inmunotolerancia extrema a una infección por una cepa salvaje de VHB que determina la ausencia de respuesta inmunitaria humoral. La fase inicial de inmunotolerancia se caracteriza por valores elevados de ADN-VHB en suero ($\geq 10^5$ copias/ml), HBeAg positivo, valores normales o casi normales de ALT y mínima actividad histológica hepática. Esta fase es de duración muy corta en las personas infectadas durante la adolescencia o en los adultos jóvenes. Sin embargo, suele durar 2-3 décadas en las personas que han adquirido la infección por transmisión vertical o en la infancia. Se han descrito estos hallazgos en individuos infectados en las situaciones anteriormente citadas y, generalmente, asociadas a los genotipos B y C del VHB; y también en pacientes que presentan un alto grado de inmunosupresión⁸.

6. Infección crónica del VHB debida a variantes del virus con mutaciones en el gen X. En estos casos, los valores séricos de HBsAg son muy bajos (inferiores a 0,5 ng/ml), aunque la reactividad del HBsAg persiste en el tiempo y puede neutralizarse. La infección cursa con ausencia de marcadores serológicos y sólo se pone de manifiesto por la detección del ADN-VHB, el cual suele estar presente en concentraciones bajas. Este perfil es muy infrecuente, y sólo se ha descrito en pacientes sometidos a hemodiálisis⁸.

7. Infección por la denominada variante del VHB conocida como VHB tipo 2 (VHB2). El VHB2 no presenta protección cruzada con la cepa salvaje del VHB, y hasta hoy no se ha podido caracterizar, por lo que la hipótesis debe ser confirmada. La reactividad del HBsAg también es débil, pero en este caso transitoria, constatándose su desaparición a las 2-3 semanas de seguimiento. El HBeAg es negativo y las pruebas de detección del ADN viral suelen serlo también, hecho que dificulta la caracterización del fenómeno. Los pacientes suelen permanecer asintomáticos y después de producirse el aclaramiento del HBsAg no se produce la seroconversión para el anti-HBc. Muchos de estos hallazgos proceden del cribado sistemático de donantes de sangre y de gestantes sanas, que permanecen sin anti-HBc demostrable durante todo el embarazo; no se ha descrito, hasta la fecha, ningún caso de hepatitis neonatal.

Reactividad aislada del anti-HBc total

El anti-HBc es el primer anticuerpo que aparece. Es detectable en suero con los primeros síntomas y durante toda la enfermedad, y permanece estable después de la curación, incluso en los casos en que el anti-HBs desaparece.

Este patrón serológico se caracteriza por la reactividad de anti-HBc en ausencia de HBsAg y anti-HBs. Su frecuencia de presentación es variable; es más frecuente en la población con prácticas de riesgo (10-25%)⁸. Se ha detectado en los sueros de personas con hepatitis crónica por el VHB, pacientes inmunodeprimidos, incluida la infección por el VIH, usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP), personas infectadas por el VHC y en individuos sanos, con exposición previa al virus o sin contacto con él.

Para poder interpretar su significado es necesario conocer la historia clínica del paciente y completar el estudio con otros marcadores: HBeAg, anti-HBe y DNA-VHB¹². Las explicaciones posibles a este perfil son las siguientes:

1. Reacciones inespecíficas inherentes a componentes del suero problema. Distintos componentes no identifica-

dos, pero presentes en el suero, pueden reaccionar con los agentes químicos utilizados en las pruebas de inmunoensayo, hecho que da lugar a resultados positivos falsos⁸. En este caso, las reactividades suelen ser bajas, el resto de los marcadores serológicos serán negativos, incluido el ADN-VHB, las enzimas hepáticas no estarán alteradas y no se identificarán comportamientos de riesgo para contraer la infección.

2. Problemas técnicos inherentes a la detección del HBsAg debido a:

- Circulación del HBsAg en forma de inmunocomplejos, que impediría su detección por los métodos convencionales. La disociación previa de éstos, mediante las distintas técnicas existentes, y la posterior detección del HBsAg libre podría ser la solución del problema¹³.

- Infección aguda o crónica por una cepa mutante en el gen S del VHB. Esta situación se identifica por la presencia de ADN-VHB en la muestra y se ha comentado en un apartado anterior.

3. Problemas técnicos inherentes a la detección del anti-HBs, debido a la variabilidad de la sensibilidad de los ensayos comerciales. Estudios comparativos han demostrado estas diferencias en pacientes con títulos bajos de anti-HBs (entre 10-100 U/ml), por lo que un suero puede ser negativo por un determinado ensayo y positivo por otro. Este hecho se ha comprobado en diferentes poblaciones y situaciones clínicas: donantes de sangre (3-5%) y pacientes con anti-HBc como único marcador de infección por el VHB (14-25%)¹⁴.

4. Coinfección por el VHC. Se ha constatado que el VHC suprime la replicación del VHB y también suprime significativamente la expresión del HBsAg, tanto in vitro como in vivo, por lo que en los individuos infectados con ambos virus, el VHC puede interferir en la síntesis del HBsAg y, por tanto, en su detección¹⁵. La positividad del ADN-VHB facilitará la interpretación del resultado.

La relevancia clínica de esta otra forma de presentación de hepatitis B oculta en pacientes con enfermedad por VHC permanece controvertida, ya que algunos estudios asocian esta situación con una mayor gravedad de la enfermedad hepática, desarrollo de carcinoma hepatocelular y falta de respuesta al tratamiento con interferón y ribavirina. Sin embargo, son necesarios más estudios para confirmarlo, ya que en otros trabajos realizados en zonas con alta endemia del VHB no se han encontrado las asociaciones antes citadas. Debido a esta hipotética asociación, otros autores proponen que, en los pacientes en los que reiteradamente sólo se encuentra el anti-HBc como único marcador de la infección por el VHB, podría considerarse realizar la detección de anticuerpos frente al VHC¹⁶.

5. Respuesta inmunitaria incompleta frente a una infección previa por el VHB. La detección en solitario de este anticuerpo define la "fase ventana". En este supuesto se contempla la prolongación de la "fase ventana", en una infección aguda, es decir, cuando el HBsAg ha desaparecido y el anti-HBs tarda en aparecer varias semanas o años. En este caso, los anticuerpos de la clase IgM frente al HBcAg (anti-HBc IgM) habrán desaparecido, y sólo con el seguimiento del paciente en el tiempo podrá constatar la seroconversión y la aparición de anti-HBs.

6. Resolución de la infección por VHB con pérdida del resto de los marcadores. Este supuesto no es frecuente, pero es posible. Para poder ponerlo de manifiesto, podría administrarse una dosis de vacuna y comprobar el efecto de "refuerzo" producido, con la consiguiente aparición de anti-HBs. En este sentido, debe tenerse en cuenta que la positividad aislada de anti-HBc no garantiza la inmunidad a la reinfección, por lo que no debe tomarse como criterio de exclusión para la vacunación⁸.

Por otra parte, hay que tener presente que una proporción no desestimable de individuos con infección pasada y resuelta presenta títulos de anti-HBs inferiores a 100 U/ml, con el problema técnico que puede suponer detectar concentraciones tan bajas, como ya se ha comentado anteriormente.

Reactividad aislada de anti-HBs en individuos no vacunados

La reactividad aislada de anti-HBs es el patrón serológico esperado en los individuos vacunados y que han respondido a la inmunización. Un título de este anticuerpo ≥ 10 U/ml se asocia con inmunidad frente al VHB con un valor predictivo del 97,6%¹⁷.

En individuos no vacunados, la frecuencia de presentación de este perfil es baja. Para poder interpretar su significado es necesario conocer la historia clínica del paciente y completar el estudio con otros marcadores: HBsAg y anti-HBc (total o IgG). El estudio del DNA-VHB puede ser opcional.

Generalmente, se obtienen reactividades bajas y en la mayoría de los casos se debe a reactividades inespecíficas producidas por la reacción de una IgM capaz de unirse al HBsAg. Otra posibilidad es la pérdida del anti-HBc en individuos infectados de forma natural (0,1-0,5%) y también puede tratarse de una respuesta inmunitaria incompleta frente a la infección producida por una cepa de VHB con algún tipo de mutación en el gen S que modifica la antigenicidad del HBsAg y también disminuye su inmunogenicidad⁸.

Se han comunicado infecciones agudas por VHB en individuos que presentaban este patrón serológico, por lo que, ante un caso con reactividad aislada para este marcador y que no documente haber sido vacunado, puede ser prudente considerar a la persona susceptible a la infección y, por tanto, proceder a su vacunación.

Coexistencia de HBsAg y anti-HBs

Este patrón se encuentra, principalmente, en pacientes con hepatitis crónica activa y hepatocarcinoma, aunque también es detectable en las infecciones crónicas persistentes, en las reactivaciones del VHB en pacientes inmunodeprimidos con marcadores previos de inmunidad a la infección, y en pacientes considerados portadores inactivos y generalmente asociados a prácticas de riesgo como los usuarios de drogas por vía parenteral (UDVP)¹⁸. En algunos pacientes con hepatitis crónica por el VHB y tratamiento antiviral, puede encontrarse en el momento en el que haya comenzado a producirse la seroconversión, por lo que es posible detectar el anti-HBs aunque todavía no exista aclaramiento total del HBsAg.

El porcentaje de presentación de este perfil es variable, del 5 al 30% según las series consultadas. Este fenómeno se conoce al menos desde 1976 y, a pesar del tiempo trans-

currido, su explicación no está aclarada. Unos autores asocian esta coexistencia con el incremento de cepas de VHB mutantes de escape, que poseen un alto porcentaje de variabilidad en el determinante "a", y que aparecen en el transcurso de una infección crónica¹⁹. Otros autores, sin embargo, no encuentran esta asociación²⁰. La explicación a esta discrepancia puede deberse al tipo de pacientes estudiados. En pacientes con hepatitis crónica HBeAg negativo y carga viral baja de VHB ($\leq 10^5$ copias/ml), se encuentra mayor porcentaje de cepas mutantes seleccionadas, mientras que los pacientes HBeAg positivo, carga viral alta ($> 10^5$ copias/ml) y valores elevados de transaminasas presentan pocas mutaciones en el gen S.

La posibilidad de detectar simultáneamente HBsAg y anti-HBs depende, en parte, de la sensibilidad y la especificidad de los reactivos utilizados para su detección. En la actualidad, ante la coexistencia de estos 2 marcadores es necesario comprobar la especificidad de los ensayos mediante las correspondientes pruebas de neutralización para ambos marcadores; también se recomienda estudiar la presencia de IgM anti-HBc, HBeAg y ADN viral, y realizar las mismas determinaciones en una nueva muestra extraída 2 semanas más tarde⁸.

Aparición de HBsAg (serorreversión) en pacientes inmunodeprimidos con marcadores previos de inmunidad y con posterior reducción o pérdida del título de anti-HBs

Este patrón es característico de las reactivaciones del VHB en pacientes inmunodeprimidos, y aparece durante o después de completar el ciclo de quimioterapia. La mayoría de los casos se ha descrito en pacientes con enfermedades hematológicas (especialmente linfomas y trasplantados de progenitores hematopoyéticos) y en pacientes con tumores sólidos²¹. En los últimos años, la introducción de los tratamientos con anticuerpos monoclonales antilinfocitos B o T, como el rituximab (anti-CD20+) o el alemtuzumab (anti-CD52+), utilizados aisladamente o en combinación con los tratamientos citotóxicos, ha aumentado el número de casos comunicados, algunos de ellos con desarrollo de hepatitis fulminante y muerte²². Otros medicamentos relacionados con la reactivación del VHB son el infliximab y el bortezomib.

En otras ocasiones, la reactivación de la infección es autolimitada o ha podido prevenirse mediante la administración de profilaxis precoz con lamivudina. No obstante, la reactivación del VHB reviste mayor gravedad cuando los pacientes son previamente HBsAg positivo; en estos casos, la mortalidad oscila entre el 5-40%.

Ante este patrón, es fundamental estudiar el ADN-VHB, que confirmará la existencia de replicación viral y, por tanto, la reactivación. El ADN viral es el marcador más precoz, ya que precede en 2-3 semanas al incremento de la ALT. Si se confirma la reactivación, se procederá a interrumpir la quimioterapia y se comenzará el tratamiento con lamivudina sola o combinada con otro antiviral.

Conclusiones

Los marcadores diagnósticos del VHB se deben seleccionar según las características clínicas del paciente y el

objetivo perseguido. En general, el diagnóstico de la hepatitis aguda por el VHB se basa únicamente en métodos serológicos. Respecto a la infección crónica, la detección y la cuantificación del ADN viral son necesarias para establecer si hay o no replicación del VHB, y es imprescindible para adoptar las medidas terapéuticas.

En algunas ocasiones, los resultados obtenidos en las pruebas serológicas son difíciles de interpretar. En estas situaciones las actitudes que se deben seguir se encaminarán a diferenciar las reactividades inespecíficas de las auténticas, verificando la especificidad de los ensayos o comprobando la sensibilidad de la prueba utilizada; se debe repetir el ensayo eligiendo técnicas o métodos diferentes. En ocasiones, será necesario obtener otra muestra lo antes posible, para analizarla junto con la que presenta el problema. Si, efectuada la repetición, no se confirman los resultados, no existirá trascendencia clínica por lo que la "reactividad anormal" se deberá a problemas técnicos de diversa índole pero, en otras ocasiones, menos frecuentes pero posibles, se repetirá el hallazgo serológico, que podrá deberse a diferentes situaciones clínicas o biológicas que será necesario conocer para efectuar la interpretación correcta de los resultados y plantear la actitud a seguir con el paciente en el futuro. No obstante, hay que tener en cuenta las limitaciones de las pruebas serológicas, por lo que en algunas situaciones, para poder obtener conclusiones, deberán realizarse estudios adicionales complementarios por métodos diagnósticos diferentes.

Bibliografía

- Gamen D, Prince AM. Hepatitis B virus infection, natural history and clinical consequences. *N Eng J Med*. 2004;350:1118-29.
- Echevarría JM, Antela A. Hepatitis B y D. En: Ausina Ruiz V, Moreno Guillén S, editores. *Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica*. Madrid: Panamericana; 2006. p. 807-21.
- Neumann AU. Hepatitis B viral kinetics: a dynamic puzzle still to be resolved. *Hepatology*. 2005;42:249-54.
- Tabor E. Infections by hepatitis B surface antigens mutants in Europe and North America. *J Med Virol*. 2006;78 Supl 1:S43-7.
- Ijaz S, Torre F, Tedder RS, Williams R, Naumov NV. Novel immunoassay for the detection of hepatitis B surface escape mutants and its application in liver transplant recipients. *J Med Virol*. 2001;63:210-6.
- Allain P. Occult hepatitis B virus infection. *Tansfus Clin Biol*. 2004;11:18-25.
- Bourne EJ, Dienstang JL, Lopez VA, Sander TJ, Longlet JM, Hall JG, et al. Quantitative analysis of HVB cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy. *J Viral Hepat*. 2007;14:55-63.
- Delgado-Iribarren A, García-Campero A, Echevarría Mayo JM, León Rega P. Serología de las hepatitis víricas. En: Cercenado E, Cantón R, editores. *Procedimientos en microbiología clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2004.
- Zaaijer HL, Vrieland H, Koot M. Early detection of hepatitis B surface antigen and detection of HBsAg mutants: a comparison of five assays. *Vox Sanguinis*. 2001;25:97-106.
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol*. 2005;32:102-12.
- Echevarría JM, León P, Pozo F. Reactividad para antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en ausencia de anticuerpos frente al antígeno de la cápside del virus de la hepatitis B: un patrón serológico atípico de significado diverso. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004;22:6-12.
- Knöhl A, Hartmann A, Hamoshi H, Weislaier K, Jilg W. Serological pattern "anti-HBc alone": characterization of 552 individuals and clinical significance. *World J Gastroenterol*. 2006;12:1255-60.
- Ackerman Z, Wands JR, Gazitt Y, Brechot C, Kew MC, Shouval D. Enhancement of HBsAg detection in serum of patients with chronic liver disease following removal of circulating immune complexes. *J Hepatol*. 1994;3:398-404.
- Weber B, Melchior W, Gehrke R, Doerr HW, Berger A, Rabenau H. Hepatitis B virus markers in anti-HBc only positive individuals. *J Med Virol*. 2001;64:312-9.
- Chu CM, Yeh CT, Liaw YF. Low level viremia and intracellular expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in HBsAg carriers with concurrent hepatitis C infection. *J Clin Microbiol*. 1998;36:2084-6.
- Colomina-Rodríguez J, González-García D, Burgos Teruel A, Fernández-Lorenz N, Guerrero-Espejo A. Significado de la reacción aislada anti-HBc como único marcador de infección en la hepatitis B. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2005;23:80-5.
- Hatzakis A, Magiorkinis E, Haida C. HBV virological assessment. *J Hepatol*. 2006;44:S71-6.
- Gerlich WH. The enigma of concurrent hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibodies to HBsAg. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1170-2.
- Lada O, Benhamou Y, Poynard T, Thibault V. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and anti-HBs antibodies in chronic hepatitis B virus carriers: influence of "a" determinant variants. *J Virol*. 2006;80:2968-75.
- Zhang JM, Xu X, Wang XY, Yin YK, Wu XH, Weng XH, et al. Coexistence of hepatitis B surface antigen (HBsAg) and heterologous subtype-specific antibodies to HBsAg among patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Infect Dis*. 2007;44:1161-9.
- Yeo W, Zee W, Zhong S, Chan PK, Wong WL, Ho WM, et al. Comprehensive analysis of risk factors associating with hepatitis B virus (HBV) reactivation in cancer patients undergoing cytotoxic chemotherapy. *J Med Virol*. 2004;90:1306-11.
- Sarrecchia C, Cappelli A, Aiello P. HBV reactivation with fatal fulminating hepatitis during rituximab treatment in a subject negative for HBsAg and positive for HBsAb and HBcAb. *J Infect Chemother*. 2005;11:189-91.