

Marcadores de replicación del virus de la hepatitis C

SILVIA SAULEDA^a Y JUAN IGNACIO ESTEBAN^b

^aCentre de Transfussió i Banc de Teixits. Institut Català de la Salut. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

^bServicio de Medicina Interna-Hepatología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

El diagnóstico virológico de la infección activa por el virus de la hepatitis C (VHC) se basa en la combinación de la determinación por enzoinmunoanálisis (EIA) de anticuerpos específicos (anti-VHC) y técnicas para la determinación cualitativa o cuantitativa de marcadores de replicación viral. Los anti-VHC indican exposición al virus, pero no confirman una infección activa, ya que suelen persistir indefinidamente tras su resolución espontánea o terapéutica. En cambio, la detección de marcadores de replicación viral confirma la infección activa, por lo que resultan esenciales para el diagnóstico de la infección aguda o crónica y para el control de la respuesta al tratamiento antiviral. Los dos marcadores de replicación viral habitualmente empleados en la práctica clínica son la presencia de ARN viral y antígeno *core* en sangre periférica.

CINÉTICA DE LOS MARCADORES DE REPLICACIÓN DEL VHC

La figura 1 muestra la secuencia temporal de aparición de los anti-VHC, y marcadores de replicación en relación con la alteración enzimática durante la infección aguda con resolución espontánea o evolución a la cronicidad. La presencia de ARN viral circulante puede detectarse dentro de las primeras 2 semanas tras la exposición y su nivel aumenta hasta alcanzar un máximo antes de la aparición de los signos biológicos de hepatitis aguda. Luego desaparece rápidamente en los casos que resuelven la infección espontáneamente (15-30% de casos) o desciende hasta estabilizarse en los que desarrollan infección persistente. No es infrecuente que, durante la fase aguda de la hepatitis, el ARN sea indetectable durante semanas para reaparecer posteriormente y establecer infección persistente. Durante la infección crónica, los valores de ARN son muy estables¹ y no guardan relación con la gravedad de la lesión hepática^{2,3}. La presencia de antígeno del *core* (cápside) del VHC en sangre, marcador fiable (aunque mucho menos sensible) de replicación viral, aparece 1-2 días después que el ARN tras la infección y sus variaciones suelen ser paralelas a las del ARN durante la infección aguda y crónica^{4,5}.

Puntos clave

- La presencia de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C indica exposición al virus pero no infección activa, a menos que se detecte un marcador de replicación viral (ARN o antígeno *core*) circulante.
- La confirmación de resolución espontánea de una hepatitis C requiere demostrar la ausencia de algún marcador de replicación en dos muestras separadas por un intervalo de 6 meses.
- Cuando la cantidad de ARN en una muestra es mayor que el límite superior de detección de una técnica de cuantificación, ésta debe volver a testarse diluida al 1:100.
- La ausencia de ARN en suero, medida con una técnica sensible (< 50 U/ml), 6 meses después de finalizado el tratamiento se considera respuesta virológica mantenida.
- En los pacientes que no logran disminuir el valor de ARN basal en al menos 2 logaritmos a las 12 semanas de tratamiento con interferón pegilado y ribavirina, éste puede interrumpirse porque no tienen posibilidad alcanzar una respuesta virológica mantenida.

TÉCNICAS DE DETECCIÓN DE ARN DE VHC CIRCULANTE

Dado el bajo nivel de virus circulante, la detección del ARN o su señal requieren el uso de técnicas moleculares para su amplificación^{2,3}.

Las técnicas de amplificación de diana consisten en la síntesis de numerosas copias (amplicones) del genoma viral mediante una reacción enzimática cíclica. Esta puede ser de dos tipos: la reacción en cadena de polimerasa (PCR), en la que, tras la retrotranscripción del ARN en ADN, los amplicones generados son ADN de doble cadena; y la amplificación isotérmica mediada por transcripción (TMA), en la que las copias del genoma son moléculas de ARN de cadena simple. En ambos casos, la identificación del producto amplificado se basa en su hibridación a oligonucleótidos sintéticos fijados a una fase sólida, seguida de la detección de los híbridos mediante una reacción enzimática sobre un sustrato colorimétrico o luminiscente.

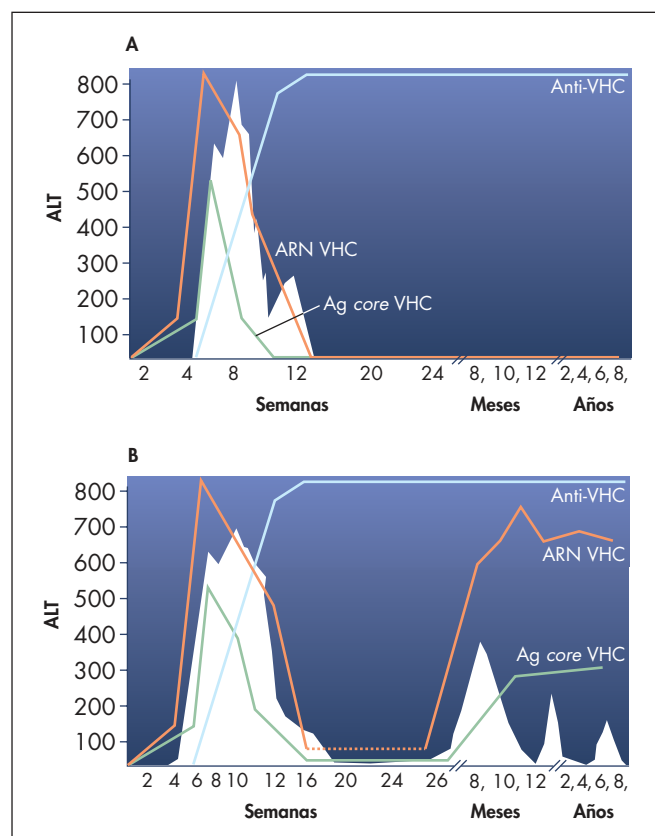


Figura 1. Secuencia temporal de anticuerpos anti-VHC, ARN VHC y antígeno del core del VHC durante la infección aguda con resolución espontánea (A) y en la infección aguda con evolución a la cronicidad (B). El sombreado blanco corresponde a los valores de alanina aminotransferasa (ALT).

Las técnicas de amplificación de diana por PCR pueden ser cualitativas o cuantitativas. La mayoría de estas últimas se basan en la coamplificación por PCR “competitiva” del ARN viral con cantidades conocidas de un estándar sintético en el mismo tubo. Las cantidades relativas de amplicones de ARN viral y estándar sintético son cuantificadas al final de la reacción y los resultados extrapolados a partir de una curva estándar generada en paralelo. Más recientemente, se han desarrollado técnicas de PCR “en tiempo real” basadas en la detección de los amplicones durante la

fase exponencial de la reacción de PCR en lugar de al final de ésta. Estas técnicas, que emplean sondas marcadas con fluorocromos cuya emisión puede detectarse al inicio de la fase exponencial, son más sensibles, tienen menor riesgo de contaminación por arrastre y, sobre todo, un rango dinámico de cuantificación (rango de niveles de ARN de la muestra original en el que la cuantificación es lineal) mucho más amplio, lo que las hace especialmente útiles para el control del tratamiento antiviral.

Las técnicas de amplificación de señal se basan en la hibridación del ARN viral sobre oligonucleótidos de captura fijados a una fase sólida, seguida de la fijación de sondas de “ADN ramificado” (bADN) que, a su vez, capturan múltiples oligonucleótidos marcados con una enzima que actúa sobre un sustrato luminiscente. Al igual que con las técnicas de PCR, la cuantificación se realiza por comparación con una curva estándar generada simultáneamente.

Técnicas de detección de antígeno core del VHC circulante

La determinación del antígeno core, producto de los primeros 191 aminoácidos de la poliproteína codificada por el genoma viral y que se polimeriza para formar junto al ARN la nucleocápside viral, requiere la disgregación de los inmunocomplejos circulantes y su captura y detección por EIA mediante anticuerpos monoclonales.

MÉTODOS DISPONIBLES PARA DETECTAR Y CUANTIFICAR ARN DE VHC

Ensayos cualitativos

La detección cualitativa del ARN viral mediante técnicas de amplificación de diana (PCR o TMA) continúa siendo útil, ya que los métodos disponibles son más sensibles que la mayoría de técnicas cuantitativas. Hay dos técnicas comerciales para la detección cualitativa del ARN viral basadas en PCR y TMA^{6,7}. La especificidad de ambas es cercana al 99% y sus respectivos límites de detección se detallan en la tabla 1.

Ensayos cuantitativos

En la tabla 1 se indican las diferentes técnicas comercialmente disponibles para la cuantificación de ARN de VHC. La OMS

Tabla 1. Técnicas estandarizadas para la detección cualitativa y cuantificación de ARN de VHC en suero

Técnica	Metodología	Límite detección U/ml	Rango dinámico (log ₁₀ U/ml)
Cobas Amplicor HCV v 2.0 ^a	RT-PCR cualitativa semiautomatizada	50	NA
Versant HCV RNA qualitative Assay ^b	TMA cualitativa	10	NA
Cobas Amplicor HCV Monitor v 2.0 ^a	RT-PCR competitiva semiautomatizada	600	2,8 -5,3
Versant HCV RNA 3.0 bDNA Assay ^b	Amplificación de señal por “ADN ramificado”	615	2,8 -6,9
LCx HCV RNA Quantitative Assay ^c	RT-PCR competitiva semiautomatizada	25	1,4 -6,4
Cobas TaqMan HCV ^a	RT-PCR en tiempo real semiautomatizada	25	1,4 -6,7

^aRoche Molecular Systems, Branchburg, NJ. ^bBayer Healthcare LLC, Tarrytown, NJ. ^cAbbott Diagnostic, Chicago, IL.

Semiautomatizada: la reacción de amplificación, detección y cálculo de la cantidad de ARN en la muestra analizada se realizan automáticamente en una plataforma específica. Para estas técnicas están disponibles plataformas adicionales que automatizan también el proceso de extracción de ARN de la muestra.

ha establecido un patrón de referencia para la estandarización de los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas⁸. En la actualidad, los resultados de todos los métodos se calculan en unidades internacionales por mililitro (U/I)⁷⁻⁹.

La cuantificación de ARN puede hacerse tanto en suero como en plasma, siempre que éste no contenga heparina. Una vez obtenida, la muestra de sangre debe centrifugarse y el suero o plasma separado del coágulo o los hematíes en un plazo no superior a 3 h y guardarse congelado a -20 °C (-80 °C para almacenamiento prolongado). Las muestras para cuantificación no deben someterse a nuevos ciclos de congelación y descongelación. Es imprescindible la estricta observancia de estas normas para la correcta interpretación de los resultados^{10,11}.

Los límites inferiores de detección de las diversas técnicas oscilan entre 30 y 615 U/ml, mientras que el límite superior varía entre 200.000 y 7.700.000 U/ml¹²⁻¹⁶. Se consideran sensibles las capaces de detectar ≤ 50 U/ml. Cuando el valor de ARN en la muestra supera el límite superior del rango dinámico, ésta debe probarse de nuevo diluida al 1:100 para su precisa cuantificación. Tal como muestra la figura 2, uno de los métodos más ampliamente utilizados para cuantificar el ARN de VHC tiene un rango dinámico cuyo límite superior no alcanza la mediana de carga viral de los pacientes con infección crónica. Con esta técnica, todas las muestras basales deben probarse directamente diluidas al 1:100¹⁶.

La especificidad de las técnicas es del 98-99% y es independiente del genotipo de VHC¹²⁻¹⁶. Sin embargo, con cualquiera de ellas no deben tenerse en cuenta variaciones inferiores

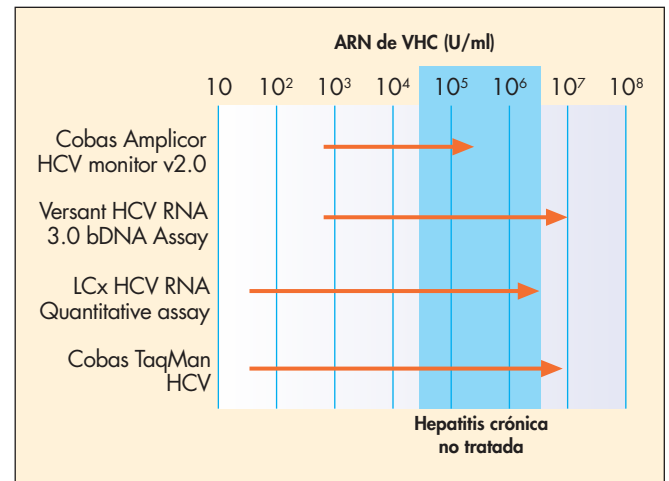


Figura 2. Comparación de los rangos de cuantificación lineal (rangos dinámicos) de distintas técnicas cuantitativas comerciales en relación con los valores de ARN viral circulante en la mayoría de pacientes con hepatitis C crónica. Aproximadamente el 90% de pacientes no tratados tiene cargas de ARN de VHC dentro del intervalo sombreado en azul.

a 0,5 logaritmos, ya que pueden corresponder a la variabilidad intrínseca del método. Variaciones en las condiciones de obtención y almacenamiento de las muestras y en la experiencia con el uso de las distintas técnicas explican los amplios coeficientes de variación obtenidos con los métodos cuantitativos en evaluaciones multicéntricas de paneles estandarizados¹⁷.

Tabla 2. Indicaciones de la determinación de marcadores de replicación del VHC en la práctica clínica

	Indicación	Objetivo	Método recomendado
Diagnóstico de infección activa	Cribado de donantes de sangre	Identificación donantes en período de ventana	ARN cualitativo Antígeno core
	Hepatitis aguda	Diagnóstico precoz Diagnóstico diferencial	ARN cuantitativo Antígeno core
	Hepatitis crónica	Indicación de tratamiento Diagnóstico diferencial	ARN cuantitativo
	Recién nacidos madre portadora	Diagnóstico transmisión materno-filial	ARN cualitativo o cuantitativo
	Elevación ALT en inmunodeprimidos	Diagnóstico infección anti-VHC negativa	ARN cualitativo o cuantitativo
	Exposición accidental a sangre contaminada	Diagnóstico precoz	ARN cualitativo o cuantitativo
Tratamiento antiviral	Evaluación pretratamiento	Confirmación replicación carga basal de referencia	ARN cuantitativo Antígeno core ^a
	Evaluación respuesta virológica a las 12 semanas	Interrupción precoz del tratamiento	ARN cuantitativo Antígeno core ^a
	Evaluación respuesta fin de tratamiento (24-48 semanas)	Diagnóstico precoz de la recidiva	ARN cualitativo
	Evaluación respuesta fin de seguimiento (48-72 semanas)	Confirmación respuesta viral sostenida	ARN cualitativo

^aLa cuantificación de antígeno core mediante enzoinmunoanálisis puede usarse para la estimación de la respuesta a las 12 semanas; siempre y cuando el valor de antígeno basal sea ≥ 200 pg/ml.

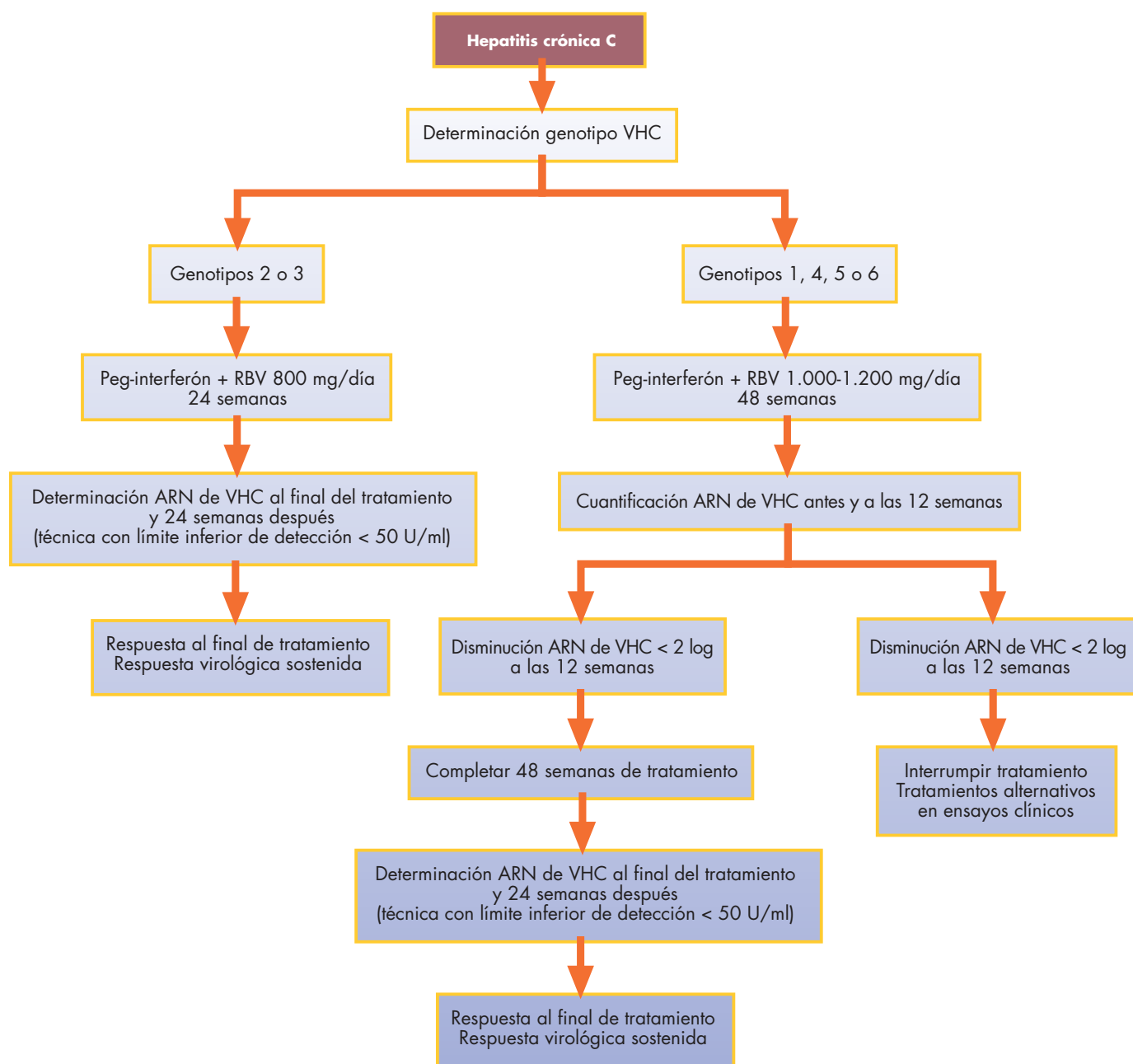


Figura 3. Algoritmo para el control de la respuesta al tratamiento antiviral combinado con interferón pegilado (Peg-interferón) y ribavirina (RBV) en la hepatitis C crónica, de acuerdo con las recomendaciones vigentes^{22-24,26}. La determinación de ARN puede sustituirse por la cuantificación de antígeno core cuando el valor de antígeno basal es ≥ 200 pg/ml.

Ensayos para detección y cuantificación de antígeno core de VHC

El antígeno core puede detectarse y cuantificarse con un EIA comercial (Track-C, Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ). El valor de antígeno (pg/ml) se correlaciona bien con el de ARN circulante, estimándose que 1 pg de antígeno equivale a un promedio de 8.000 U de ARN, aunque esta relación es muy variable entre pacientes¹⁸. La técnica es incapaz de detectar antígeno en muestras con valores de ARN inferiores a 20.000 U/ml, lo que limita su utilidad para el control de la respuesta al tratamiento o para el diagnóstico cuando el grado de replicación es bajo. Su principal ventaja es su simplicidad, por

lo que es útil cuando no se dispone de infraestructura adecuada para determinar ARN^{4,5,18,19}.

USO PRÁCTICO DE LOS MARCADORES DE REPLICACIÓN DEL VHC

Las aplicaciones prácticas de la determinación de marcadores de replicación del VHC se exponen en la tabla 2. Se pueden resumir en dos: el diagnóstico de infección activa y la indicación de tratamiento antiviral y control de la respuesta a éste.

Diagnóstico de infección activa

Dado que en la infección aguda la aparición de anti-VHC (se-roconversión) detectables con las técnicas EIA de tercera gene-ración ocurre entre 6 y 12 semanas después de la exposición (período de ventana), mientras que los marcadores de replica-ción son detectables en las primeras 2 semanas, la determina-ción de ARN o de antígeno *core* se emplean para identificar in-fección por VHC, en ausencia de anti-VHC, en el cribado de donantes de sangre^{5,20}, en pacientes con hepatitis aguda sero-negativa para otros virus o tras exposición accidental percutá-nea a sangre contaminada. Dado que el ARN viral puede ser indetectable durante varias semanas en la fase aguda de la he-patitis C, para asegurar la resolución de la infección, la ausen-cia de ARN debe confirmarse en una nueva muestra obtenida 6 meses después.

Los marcadores de replicación también se emplean en pacien-tes que han recibido hemodiálisis o inmunodeprimidos (hipo-gammaglobulinemia, sida, tratamiento inmunosupresor) que pueden no ser capaces de desarrollar anticuerpos específicos, cuando una alteración de pruebas hepáticas sugiere la presen-cia de hepatitis aguda o crónica.

Teniendo en cuenta que la detección de anticuerpos no confir-ma la presencia de infección persistente, en pacientes con he-patitis crónica anti-VHC positivos su determinación está indi-cada cuando se requiere establecer el diagnóstico diferencial con otras causas de hepatopatía o antes de indicar tratamiento antiviral. En los neonatos de madre con infección activa por VHC, debido a la transferencia pasiva de anti-VHC maternos, la transmisión de la infección sólo puede confirmarse durante los primeros 12 meses de vida mediante detección de ARN cir-culante²¹.

Control de la respuesta al tratamiento antiviral de la hepatitis C crónica

En la actualidad, el tratamiento estándar de la hepatitis C cró-nica se basa en la combinación de interferón pegilado y ribavi-rina durante 24 o 48 semanas²²⁻²⁶. El objetivo del tratamiento es la erradicación viral o respuesta viral sostenida (RVS) defi-nida como la ausencia de ARN en suero (< 50 U/ml) 6 meses después de haber finalizado. Con esta definición se consigue RVS en algo más del 50% de pacientes tratados durante 24-48 semanas (45% de pacientes con genotipo 1, 4, 5 o 6 tratados durante 48 semanas y 80% en pacientes con genotipos 2 o 3 tratados durante 24 semanas). Se define como respuesta viro-lógica precoz (RVP) una disminución de la carga viral ≥ 2 lo-garismos a las 12 semanas de tratamiento^{23,24}. Los pacientes que no logran una RVP no tienen ninguna posibilidad de al-canzar RVS, por lo que se recomienda suspender el tratamien-to para disminuir costes y evitar efectos adversos innecesarios. La ausencia de respuesta virológica (ARN < 50 U/ml) al final del tratamiento (RVFT) es altamente predictiva de recidiva postratamiento, por lo que debe determinarse el ARN sérico en este momento. La figura 3 muestra el algoritmo recomen-dado para el control del tratamiento de elección de la hepatitis C crónica^{22,24,26}.

BIBLIOGRAFÍA



● Importante ●● Muy importante

1. Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB, Mondala T, Pockros PJ, Lindsay KL, et al. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated pa-tients with chronic HCV infection. *J Viral Hepat.* 1996;3:75-8.
2. ● Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology.* 2002;122:1554-68.
3. ● Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepa-tology.* 2002;36 Suppl 1:S65-73.
4. Bouvier-Alias M, Patel K, Dahari H, Beaucourt S, Larderie P, Blatt L, et al. Clini-cal utility of total hepatitis C virus (HCV) core antigen quantification, a new indi-rect marker of HCV replication. *Hepatology.* 2002;36:211-8.
5. Courouce AM, Le Marrec N, Bouchardeau F, Razer A, Maniez M, Laperche S, et al. Efficacy of HCV core antigen detection during the preseroconversion period. *Transfusion.* 2000;40:1198-202.
6. Hendricks DA, Friesenhahn M, Tanimoto L, Goergen B, Dodge D, Comanor L. Multicenter evaluation of the VERSANT HCV RNA qualitative assay for detection of hepatitis C virus RNA. *J Clin Microbiol.* 2003;41:651-6.
7. Lee SC, Antony A, Lee N, Leibow J, Yang JQ, Soviero S, et al. Improved version 2.0 qualitative and quantitative AMPLICOR reverse transcription-PCR tests for hepatitis C virus RNA: calibration to international units, enhanced genotype reactiv-ity, and performance characteristics. *J Clin Microbiol.* 2000;38:4171-9.
8. Saldanha J, Lelie N, Heath A. Establishment of the first international standard for nucleic acid amplification technology (NAT) assays for HCV RNA. WHO Colla-borative Study Group. *Vox Sang.* 1999;76:149-58.
9. Pawlotsky JM, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, Remire J, Dhumeaux D. Standardization of hepatitis C virus RNA quantification. *Hepatology.* 2000;32:654-9.
10. Davis GL, Lau JY, Urdea M S, et al. Quantitative detection of hepatitis C virus RNA with a solid-phase signal amplification method: definition of optimal condi-tions for specimen collection and clinical application in interferon-treated patients. *Hepatology.* 1994;19:1337-41.
11. Halfon P, Khiri H, Gérolami V, et al. Impact of various handling and storage condi-tions on quantitative detection of hepatitis C virus RNA. *J Hepatol.* 1996;25:307-11.
12. Pradat P, Chosegros P, Bailly F, Pontisso P, Saracco G, Sauleda S, et al. Compari-son between three quantitative assays in patients with chronic hepatitis C and their relevance in the prediction of response to therapy. *J Viral Hepat.* 2000;7:203-10.
13. Trimoulet P, Halfon P, Pohier E, Khiri H, Chene G, Fleury H. Evaluation of the VERSANT HCV RNA 3.0 assay for quantification of hepatitis C virus RNA in se-rum. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2031-6.
14. Konnick EQ, Williams SM, Ashwood ER, Hillyard DR. Evaluation of the COBAS Hepatitis C Virus (HCV) TaqMan analyte-specific reagent assay and comparison to the COBAS Amplicor HCV Monitor V2.0 and Versant HCV bDNA 3.0 assays. *J Clin Microbiol.* 2005;43:2133-40.
15. Germer JJ, Harmsen WS, Mandrekar JN, Mitchell PS, Yao JD. Evaluation of the COBAS TaqMan HCV test with automated sample processing using the MagNA pure LC instrument. *J Clin Microbiol.* 2005;43:293-8.
16. ● Gourlain K, Soulier A, Pellegri B, Bouvier-Alias M, Hezode C, Darthuy F, et al. Dynamic range of hepatitis C virus RNA quantification with the Cobas Ampliprep-Cobas Amplicor HCV Monitor v2.0 assay. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1669-73.
17. Lefrere JJ, Roudot-Thoraval F, Lunel F, Alain S, Chaix ML, Dussaix E, et al. Ex-pertise of French laboratories in detection, genotyping, and quantification of hepa-titis C virus RNA in serum. *J Clin Microbiol.* 2004;42:2027-30.
18. Schuttler CG, Thomas C, Discher T, Friese G, Lohmeyer J, Schuster R, et al. Vari-able ratio of hepatitis C virus RNA to viral core antigen in patient sera. *J Clin Mi-crobiol.* 2004;42:1977-81.
19. Seme K, Poljak M, Babic DZ, Mocilnik T, Vince A. The role of core antigen detec-tion in management of hepatitis C: a critical review. *J Clin Virol.* 2005;32:92-101.
20. Operskalski EA, Mosley JW, Tobler LH, Fiebig EW, Nowicki MJ, Mims LT, et al. HCV viral load in anti-HCV-reactive donors and infectivity for their recipients. *Transfusion.* 2003;43:1433-41.
21. Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Hino K, Ishiwa C, Kako M, et al. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *N Engl J Med.* 1994;330:744-50.
22. Fried MW, Shiffman ML, Reddy K, Smith C, Marinos G, Gonçales FL Jr, et al. Peg-interferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002;347:975-82.
23. ●● Davis G, Wong J, McHutchson J, et al. Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003;38:645-52.
24. ●● Hadziyannis SJ, Sette H Jr, Morgan TR, et al. Peginterferon-alpha2a and ri-bavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treat-ment duration and ribavirin dose. *Ann Intern Med.* 2004;140:346-55.
25. Bräu N. Treatment of chronic hepatitis C in human immunodeficiency virus/hepa-titis C virus-coinfected patients in the era of pegylated interferon and ribavirin. *Semin Liver Dis.* 2005;25:33-51.
26. ●● NIH Consensus Development Conference Statement: management of hepa-titis C. *Gastroenterology.* 2002;123:2082-99.