

Reunión conjunta con unidades centinela de hepatitis – (Parte I)

Coordinador: Dr José O. Curciarello

Secretaria: Dra Silvia Borzi

Aplicación de la Biología Molecular en Pacientes con Hepatitis C Dr Fabián Fay	Página 40
Hepatitis C en Renales Crónicos Dra Cristina Alonso	Página 41
Hepatitis C. Manifestaciones Extrahepáticas Dra Virginia Reggiardo	Página 42

Aplicaciones de la biología molecular en el diagnóstico y tratamiento del virus de la hepatitis C

Fabián Fay

En la actualidad las herramientas diagnósticas basadas en biología molecular que se utilizan tanto para el diagnóstico como para el monitoreo del tratamiento de la Hepatitis por Virus C son las siguientes:

- Detección cualitativa del HCV-RNA por PCR en suero o plasma.
- Determinación del Genotipo de HCV
- Cuantificación del HCV-RNA viral en suero o plasma (carga viral)

Detección cualitativa de HCV-RNA en suero o plasma

Consiste en determinar la existencia de RNA del HCV 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).

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. Los resultados que arroja este test son Positivo o No detectable.

Independientemente del tipo de método que se utilice, debe informarse el límite inferior de detección del ensayo contra un estándar internacional de HCV RNA, con el objeto de definir la sensibilidad del ensayo. La mayoría de los métodos comerciales actuales tienen sensibilidades entre 25 y 50 UI/ml.

Aplicaciones de la detección cualitativa de HCV-RNA (HCV-RNA PCR cualitativa)

- , Determinar la presencia de viremia 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.

- , Descarte de sangre y hemoderivados por infección con HCV.

- , Confirmar replicación viral antes del inicio del tratamiento antiviral.

- , Evaluar Respuesta Viroológica al tratamiento antiviral

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 con serología anti HCV negativa, con el objeto de detectar unidades infecciosas en período de ventana. En la actualidad, internacionalmente se utilizan pooles que no superen las 24 muestras. La utilización de métodos caseros o adaptaciones de métodos diagnósticos carecen de la sensibilidad, especificidad y estabilidad como para ser utilizados.

Determinación del Genotipo de HCV

Consiste en la definición del genotipo del HCV predominante en el paciente infectado utilizando la clasificación de Simmonds. No se ha demostrado que el genotipo es un factor determinante en la historia natural de la enfermedad.

Su utilización sólo se aplica a pacientes que serán sometidos a terapia antiviral como factor predictivo de respuesta al tratamiento antiviral y define el tiempo de duración del mismo. Para ello es imprescindible realizar esta determinación antes de iniciar el tratamiento antiviral.

Una vez caracterizado el genotipo, no es necesario volver a realizar esta determinación, ya que salvo en poblaciones que puedan estar multi-expuestas a infección por

HCV (como ejemplo: drogadictos endovenosos) el genotipo no varía en el curso de la infección.

El método de referencia para la definición del genotipo es la Secuenciación. Otros métodos utilizables son el: RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción) o LiPA (Linear Inmuno Probe Assay). Estos últimos son los mayormente utilizados en nuestro medio por una cuestión de costos y tiempos de resolución. Todos se basan en el análisis de la región 5' NC del virus para la definición del genotipo e involucran una amplificación previa por PCR, detectando 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).

En nuestro país los genotipos prevalentes son el 1 y el 2, con diferentes porcentajes según la región analizada. El genotipo 3 también circula en la Argentina y se lo ha observado en mayor proporción en poblaciones de drogadictos endovenosos.

Determinación de Carga Viral de HCV RNA

Consiste en la cuantificación de la cantidad de virus circulante en sangre del paciente infectado.

Solo son utilizables métodos comerciales validados internacionalmente que expresen sus resultados en UI/ml estandarizados contra el estándar de la Organización Mundial de la Salud

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®)	
Monitor HCV Amplicor v. 2.0 (Roche Diagnostics®) (Manual/Cobas)	615 – 7.700.000 UI/ml
NASBA HCV cuantitativo (Biomérieux®)	600 – 800.000 UI/ml
	280 – 28.000.000 UI/ml

Hepatitis C en renales crónicos

Cristina Alonso

Epidemiología

Entre los pacientes con insuficiencia renal terminal en etapa de hemodiálisis y transplantados renales, la hepatitis C es la hepatopatía más común que se presenta.

Los pacientes en hemodiálisis están dentro de los grupos de mayor riesgo para contraer la infección.

Su prevalencia media en la Argentina ha disminuido desde el 50 % a principios de la década del 90 llegando a ser entre el 11 % y 24 % en los últimos años con una incidencia anual del 2,7 %.

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.

La negatividad de la carga viral no necesariamente implica la ausencia de viremia ya que pueden existir pacientes con viremia no cuantificable por esta metodología pero detectable por los ensayos cualitativos de mayor sensibilidad.

No existe evidencia que relacione los valores de viremia con la historia natural de la enfermedad.

Su determinación solo es aplicable en pacientes que serán sometidos a tratamiento antiviral.

Aplicaciones:

β Determinación basal pre-tratamiento en los pacientes portadores de genotipos 1 y 4. En los pacientes portadores del Genotipo 2 y 3, podría no realizarse en función de la alta tasa de respuesta de los mismos al tratamiento antiviral. Sin embargo algunos trabajos sostienen que seguiría siendo útil si se plantea monitorear el paciente con esta herramienta intra-tratamiento.

β Determinación intratratamiento como herramienta de evaluación de respuesta virológica temprana en pacientes portadores de genotipos 1 y 4.

Se considera como factor predictivo positivo de respuesta virológica sostenida al tratamiento la negativización o la reducción de la viremia en al menos 2 log a las 12 semanas del tratamiento.^{4,12,13,14,20}

Las vías de contagio más frecuentes son la vía transfusional, y la transmisión intranosocomial. La vía transfusional ha disminuido desde que la sangre es controlada en los bancos de sangre para detección de las hepatitis virales y también ha disminuido la vía intranosocomial gracias a la aplicación de las medidas universales de bioseguridad recomendadas por el C.D.C. Aun así, hoy en día sigue siendo un problema y un tema controvertido.

Detección y diagnóstico

La infección por HCV en el hemodializado se sabe que es silenciosa, que evoluciona a la cronicidad entre el 70 - 80%, con viremia positiva en el 90% de los casos, las

transaminasas en este grupo de pacientes son normales o tienen elevaciones esporádicas y leves de las mismas y el genotipo predominante es el 1.

Screening y seguimiento

Se recomienda realizar anti HCV y ALT al iniciar la hemodiálisis siguiendo al paciente con ALT mensuales, anti HCV trimestrales y RNA HCV (por PCR) anual o cuando se detecta ALT elevadas. La posibilidad de realizar un PCR anual estaría justificado por ese 12% de pacientes que al ser inmunocomprometidos no desarrollan anticuerpos pero tienen la infección.

Tratamiento

La necesidad del tratamiento de la infección sería según el paciente y la posibilidad o no de trasplante renal.

Como la enfermedad es de evolución lenta, está relacionada al tiempo de hemodiálisis y al comportamiento de las aminotransferasas, debe estudiarse y evaluarse cada caso en particular como la necesidad o no del tratamiento y cuando realizar el mismo.

El tratamiento aceptado hoy en día es el interferón α 2a ó α 2b recombinante normalmente en dosis de 3MU tres veces por semana por 48 semanas. En la actualidad hay algunos trials con poco número de pacientes que están utilizando el interferón peguilado pero aún no hay datos finales de tolerancia ni mayor eficacia que el interferón convencional.

La conducta es distinta ante un paciente que está en

evaluación para trasplante renal. En este grupo sí es necesario la realización de una biopsia hepática para determinar el grado de daño hepático y evaluar posibilidad de tratamiento pretrasplante con la finalidad de trasplantarlo sin viremia si bien se sabe que hay reactivación del mismo en gran número de pacientes después del trasplante.

Si el paciente no tiene cirrosis en la biopsia hepática no está contraindicado el trasplante, si la cirrosis es compensada se puede indicar el trasplante explicándole al paciente sus riesgos y si es una cirrosis descompensada el proponer doble trasplante, situación problemática hasta la fecha.

En el candidato a trasplante con infección por HCV hay que evaluar la calidad del riñón del donante, el cual conviene sea óptimo para evitar mayor inmunosupresión. También evaluar el tipo de inmunosupresión a usar.

Trasplante renal

La incidencia que tiene el virus en la sobrevida del injerto y del paciente en hemodializados versus trasplantados renales es incierta pues aunque se sabe que la inmunosupresión favorece la mayor actividad viral, no hay datos concluyentes que muestren que la morbimortalidad sea mayor en estos últimos, por lo menos en la primera década después del trasplante.

En el paciente trasplantado no hay tratamiento factible en la actualidad para la hepatitis C, sólo su control periódico y manejo de las hepatopatías en etapa avanzada.

Hepatitis C. Manifestaciones extrahepáticas C

Virginia Reggiardo

Un escaso número de pacientes crónicamente infectados con el virus de hepatitis C (VHC) presentan manifestaciones sistémicas clínicamente relevantes.

La presencia de autoanticuerpos (FAN, AML, LKM) generalmente en títulos bajos, crioglobulinas y Factor Reumatoideo son un hallazgo relativamente común y representan un fenómeno inmunológico inespecífico, secundario a una infección viral crónica activa.¹

No es bien conocido el mecanismo por el cual un paciente desarrolla enfermedad sistémica asociada al virus C. Múltiples patologías, la mayoría de ellas de origen autoinmune, han sido relacionadas a este virus, sin embargo, sólo se ha podido demostrar una fuerte asociación causal con la Crioglobulinemia Mixta, generalmente tipo II y sus complicaciones.^{1,2}

La Crioglobulinemia Mixta está caracterizada por la presencia en sangre de anticuerpos policlonales IgG, y de

anticuerpos IgM con actividad de factor reumatoideo (antianticuerpos), de tipo monoclonal en la Crioglobulinemia Tipo II o policlonal en la Tipo III, que precipitan a temperatura menor de 37°C.

La prevalencia de crioglobulinemia en pacientes con infección crónica a virus C es muy variable en las diferentes series (35-90%), y si bien esto puede atribuirse a variaciones geográficas se debe tener en cuenta que una selección de la población con enfermedad de mayor duración, puede aumentar la verdadera prevalencia.^{3,4} Existe coincidencia en que sólo una minoría de los pacientes con crioglobulinas circulantes presentan manifestaciones clínicas de esta enfermedad.

Clínicamente se caracteriza por la tríada de púrpura, astenia y artralgias, estos síntomas se deben a una vasculitis sistémica por inmunocomplejos con inflamación de vasos de pequeño calibre. La púrpura palpable corresponde histológicamente a vasculitis leucocitoclástica. Las artralgias se asocian a una mono u oligoartritis no destructiva que afecta articulaciones grandes y medianas. Aproximadamente un tercio de los pacientes presentan glome-

rulonefritis principalmente de tipo membranoproliferativa. Otras manifestaciones son la polineuropatía, el fenómeno de Raynaud y el Sme. de Sjögren.

La prevalencia de infección por VHC en pacientes con Crioglobulinemia Tipo II es alta por lo que en la mayoría de los casos esta enfermedad ya no se considera “esencial”.⁵⁻⁶ El mecanismo por el cual la infección por VHC causa crioglobulinemia no está bien aclarado. Se ha sugerido como causa probable la estimulación de la proliferación de Linfocitos B por antígenos del VHC (E2) a través de los receptores CD81. Es controvertida la capacidad del virus de replicar dentro de los linfocitos; siendo su capacidad de estimulación crónica, la responsable de la aparición tanto en hígado como en sangre de poblaciones clonales de linfocitos B productores de Ac con actividad de Factor reumatoideo, que forman los inmunocomplejos que causan la crioglobulinemia.⁷⁻⁸ Esta capacidad del VHC parece jugar un papel importante en la etiopatogenia del Linfoma no Hodgkin de Cel. B. Esta asociación, aun controvertida, es una complicación conocida de la Crioglobulinemia tipo II de larga duración, y en los últimos años ha sido considerado como otra probable manifestación extrahepática del Virus C.⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹²

Otras manifestaciones extrahepáticas del virus C cuya asociación no ha sido tan claramente demostrada son: el Liquen plano, la Sialoadenitis, la Porfiria cutánea tarda, la enfermedad tiroidea (Hipo/hipertiroidismo) y la trombocitopenia autoinmune.

La crioglobulinemia y sus complicaciones, vasculitis y glomerulonefritis responden en general al tratamiento antiviral con Interferón asociado a ribavirina (IFN + RBV), y recientemente se ha utilizado con éxito la combinación con Interferón Pegilado.¹³ La dosis óptima y la duración de la terapia aun no han sido claramente definidas.¹⁴ La plasmaféresis y criofiltración estarían indicados para pacientes con enfermedad aguda y severa. El rituximab (Ac monoclonal anti CD20) ha sido de utilidad en algunos pacientes no respondedores, pero puede aumentar la carga viral del VHC.¹⁵⁻¹⁶

El tratamiento del resto de las manifestaciones extrahepáticas del VHC no está claro, la indicación de tratamiento antiviral (IFN + RBV) debe ser considerado con cautela debido al origen autoinmune de muchas de estas patologías y la posibilidad de exacerbar la enfermedad

Distintos tipos de Linfoma No Hodgkin han sido asociados al VHC, tratándose en su mayoría de linfomas de baja agresividad que responden a esquemas de quimioterapia habituales.¹⁷⁻¹⁸ Recientemente se ha reportado regresión de linfoma esplénico luego del tratamiento del VHC, lo que plantea nuevas opciones terapéuticas.¹⁹

La aparición de manifestaciones extrahepáticas del virus C responde a un mecanismo aun no bien conocido. Las amplias variaciones geográficas de su incidencia y la disparidad de los datos reportados, sugieren que factores genéticos y medioambientales juegan un rol preponde-

rante en este mecanismo, junto con la compleja interrelación del VHC con el sistema inmunológico del huésped.

Bibliografía

- 1- Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations on HCV infection: Some current issues. *Journal of Hepatology* 2004; 40: 341-352.
- 2- Medina J, García-Buey L, Moreno Otero R. Hepatitis C Virus-related extra-hepatic disease-aetiopathogenesis and management. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 129-141
- 3- Lunel F, Musset L. Mixed Cryoglobulinemia and hepatitis C virus infection. *Minerva Med* 2001;92: 35-42
- 4- Kayali Z, Buckwold VE, Schimdt WN, et al. Hepatitis C, cryoglobulinemia and cirrhosis: a meta-analysis. *Hepatology* 2002; 36: 978-985
- 5- Agnello V, Chung R, Kaplan L. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Eng J Med* 1992: 327; 1490-1495
- 6- Misiani R, Bellavita P, Fenili D, et al. Hepatitis C virus infection in patients with essential mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med* 1992; 84: 3047-3053
- 7- Sansonno D, Lauletta G, Dammaco F, et al. Intrahepatic B cell clonal expansions and extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *Eur J Immunol* 2004; 34: 126-136
- 8- Vallat L, Cacoub P, Benhamou Y, et al. Clonal B Cell Populations in the Blood and Liver of patients with chronic hepatitis C virus infection. *Arthritis & Rheumatism* 2004; 50:3668-3678
- 9- Hausfater P, Cacoub P, Sterkers Y, et al. Hepatitis C virus infection in lymphoproliferative diseases: prospective study on 1576 patients in France. *Am j Hematol* 2001; 67: 168-171
- 10- Mele A, Pulsoni A, Blanco E., et al. Hepatitis C virus and B cell non-Hodgkin's Lymphoma. An Italian multicentric case control study. *Blood* 2003; 102:996-999
- 11- Gilbert J, García Buey L, Pajares J, Moreno Otero R. Prevalence of hepatitis C virus infection in B- cell- non-Hodgkin's Lymphoma. Systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology* 2003; 125: 1723-1732
- 12- Ohsawa M, Shingu N, Miwa H, et al. Risk of Non-Hodgkin's Lymphoma in patients with hepatitis C virus infection. *Int J Cancer* 1999; 80: 237-239
- 13- Cacoub P, Piette J, et al. PEGylated interferon alfa2b and Ribavirin treatment in patients with Hepatitis C Virus- related systemic vasculitis. *Arthritis & Rheumatism* 2005; 52: 911-915
- 14- Consenso Argentino Hepatitis C 2004
- 15- Sansonno D, Re VD, Dammaco F, et al. Monoclonal antibody treatment of mixed cryoglobulinemia resistant to interferon alpha with anti-CD20. *Blood* 2003; 101: 3818-3826
- 16- Zaja F, Vita SD, Mazzaro C, et al. Efficacy and safety of rituximab in type II mixed cryoglobulinemia. *Blood* 2003; 101: 3827-3834
- 17- Mazzaro C, Tirelli U, Pozzato G. Hepatitis C virus and non-Hodgkin's lymphoma 10 years later. *Dig Liver Dis* 2005; 37:219-26.
- 18- Monti G, Pioltelli P, Invernizzi F, et al. Incidence and characteristics of non-Hodgkin lymphomas in a multicenter casefile of patients with hepatitis C virus-related symptomatic mixed cryoglobulinemias. *Arch Intern Med*. 2005; 165: 101-5.
- 19- Olivier H, Lefrère F, Troussard X, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C Virus Infection. *N Eng J Med* 2002; 347: 89-94