

FRECUENCIA DE VARIANTES DEL DETERMINANTE “a” DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN PORTADORES CRÓNICOS ESPAÑOLES NO SELECCIONADOS.

Avellón Calvo, Ana¹, Echevarría Mayo, José Manuel¹.

¹Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda

Ana Avellón Calvo. Laboratorio de Hepatitis. Centro Nacional de Microbiología. Cra. Majadahonda a Pozuelo Km.2. Majadahonda 28220 Madrid. aavellon@isciii.es

Introducción:

La infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB) afecta a más de 350 millones de personas en todo el mundo provocando con frecuencia hepatitis crónica. El control de la enfermedad ha sido progresivo a lo largo de los años debido fundamentalmente a la vigilancia de las posibles fuentes de infección. Concretamente la disminución de la incidencia de casos en los países desarrollados se debe a los siguientes hechos: (i) Control de los hemoderivados mediante la determinación en todas las unidades del antígeno de superficie del VHB (AgHBs). En España esta vigilancia se lleva realizando desde los años setenta y actualmente se estima que la incidencia de infección por VHB post transfusión es muy baja (1); (ii) Control de la transmisión vertical mediante la búsqueda de gestantes portadoras de AgHBs y profilaxis posterior con inmunoglobulina específica del neonato; (iii) Vacunación inicialmente en grupos de riesgo y posteriormente vacunación universal al nacimiento mediante vacuna recombinante específica basada en el AgHBs.

Actualmente la aparición de mutaciones puntuales en el AgHBs y concretamente en su parte más inmunógena denominada determinante “a” preocupa por la posibilidad de que afecte a la detección del AgHBs por los sistemas comerciales de detección de uso común en los laboratorios de Microbiología y de los Bancos de Sangre (2). Además estas mutaciones podrían tener un efecto crítico en la inmunoprofilaxis ya que su existencia se ha asociado en la literatura con resistencia a la inmunoterapia (3, 4) y con escape a la vacuna (5-7). La aparición de virus con las mutaciones anteriormente citadas es un hecho conocido desde hace tiempo, ya que se han ido describiendo casos de falsos negativos de AgHBs, resistencia a inmunoterapia y escape a vacuna asociados. Sin embargo ni la prevalencia en población general ni en portadores crónicos ha sido establecida, con lo que la importancia sanitaria real de estos mutantes no se conoce en realidad. Además la capacidad de detección de los distintos sistemas comerciales de uso común para la detección de AgHBs es variable y se requerirían estudios comparativos amplios no solo con mutantes recombinantes sino también con mutantes naturales. Por todo ello los objetivos del presente estudio son los siguientes:

1. Conocer la prevalencia en España de variantes del determinante “a” en portadores crónicos del virus de la Hepatitis B (VHB) no seleccionados. Estas variantes se relacionan en la literatura con escapes a la protección vacunal, con resistencia a la inmunoterapia y con defectos en la detección del antígeno de superficie (AgHBs) mediante sistemas de inmunoensayo comerciales. Establecer la prevalencia total y por genotipo.
2. Comprobar la capacidad de detección del AgHBs mediante dos de los sistemas comerciales más utilizados en España en las muestras con mutaciones.

Personas de estudio y métodos

Se analizó la existencia de mutaciones en el VHB de 272 portadores crónicos no seleccionados. El único requisito para ser incluido en el estudio fue que al paciente le

fuese solicitada determinación de DNA de VHB durante el periodo de estudio (2001-2002) y que esta fuese positiva.

Se realizó amplificación parcial del gen que codifica para AgHBs y Polimerasa (posiciones 112 a 212 del AgHBs) mediante PCR *nested* según método descrito previamente (8). A partir de los productos de amplificación se realizó secuenciación directa con los oligonucleótidos de segunda reacción. Posteriormente se realizó el estudio de la secuencia de nucleótidos y de aminoácidos realizando comparaciones por genotipo y determinando así la secuencia consenso para cada grupo genético. Se consideraron las posiciones 112 a 157 y se estableció mutación en cada posición cuando esta difería del consenso estimado. Dentro del intervalo estudiado solo se consideró mutación si la posición de aminoácido en cuestión había sido comunicada en la literatura como asociada a fallos en la detección de AgHBs, a resistencia a la terapia con inmunoglobulina o a escape vacunal. Para la comparación estadística entre grupos se utilizó el test de Chi cuadrado, considerando el nivel de significación p en 0.05 o menor. La determinación del AgHBs se realizó mediante sistemas comerciales, dos automáticos (sistema 1: Vitros, Ortho-Clinical y sistema 2: AxSYM, Abbott) y uno manual (sistema 3: Auszyme, Abbott) siguiendo las indicaciones de los correspondientes fabricantes. Las muestras utilizadas fueron ensayadas sin diluir en el sistema 1, diluidas al 1:40 en el sistema 2 y diluidas al 1:10 en el sistema 3.

Resultados

Considerando las posiciones 112 a 157, se observaron mutaciones únicas o múltiples en el 39% de las muestras estudiadas. No se encontraron diferencias en el número de mutaciones encontradas cuando se dividían por año de estudio, sexo del paciente, edad del paciente, genotipo viral A/D o subtipos ayw/adw. Algunas posiciones fueron 100% conservadas: 121, 135, 137, 139, 140, 141, 142, 146, 147, 148, 149, 151, 152, 153, 155, 156 y 157 (Figura 1). Dividiendo las sustituciones de aminoácido según el efecto esperable de acuerdo a publicaciones previas, el 12.5% de los pacientes estudiados tenía una mutación asociada a fallos en los tests diagnósticos de AgHBs, el 6.6% una mutación que le confería resistencia a la vacuna y el 9.2% una mutación que lo hacía resistente a la terapia con inmunoglobulina. Las mutaciones más frecuentes fueron Met133Thr (2.2%) y Gln129His, Met133Ile, Phe/Tyr134Asn (1.8% cada una). La mutación Gly145Arg estaba presente solamente en un 0.4% de los casos (Figura 1). Los valores de frecuencia de mutación para cada posición total y por genotipo pueden consultarse en una publicación previa (9).

En los ensayos de detección del AgHBs (Figura 2, Tabla 1) la mayoría de las muestras fueron correctamente detectadas con amplio margen, situándose en el cuadrante superior derecho de gráfico de dispersión. Las muestras correspondían a todos los genotipos conocidos excepto G y H. Los genotipos más frecuentes fueron D y A (10). Solamente 6 muestras dieron negativo o débilmente positivo en alguno de los métodos estudiados. Las muestras con problemas de reactividad contenían una o varias de las siguientes posiciones afectadas: 120, 123, 143, 144, 145, todas ellas relacionadas en la literatura con problemas de detección. Dos de las seis muestras contenían mutaciones múltiples. Las sustituciones de aminoácido en posiciones 143 y 144 (m33 y m1) parecían relacionarse con dificultades en la detección por uno solo de los dos métodos estudiados. La única muestra que resultó negativa por varios de los métodos estudiados (m34) contenía la mutación Gly145Arg.

Conclusiones y recomendaciones

1. La presencia de mutaciones en el determinante “a” es inesperadamente alta y variada en sus posiciones, encontrándose en ocasiones sustituciones múltiples.
2. La identificación de posiciones conservadas al 100% puede orientar en el diseño de sistemas de detección de AgHBs más sensibles y específicos.
3. Los porcentajes de escape a la vacuna estimados en este trabajo en un 6.6% deberían ser vigilados, así como determinado su efecto real para, en su caso, rediseñar las vacunas incluyendo las variantes.
4. A pesar del alto porcentaje de muestras con teóricos problemas en la detección de AgHBs, el efecto en los dos sistemas comerciales más utilizados en España es escaso. Solamente muestras con mutación en posiciones 143 a 145 (especialmente Gly145Arg) o con mutaciones múltiples dan reactividades débiles o incluso negativas por alguno de los test empleados. En estas muestras concretas, la capacidad de cada uno para ser detectadas es diferente, por lo que son factores a tener en cuenta a la hora de elegir las pruebas diagnósticas.

Figuras y Tablas:

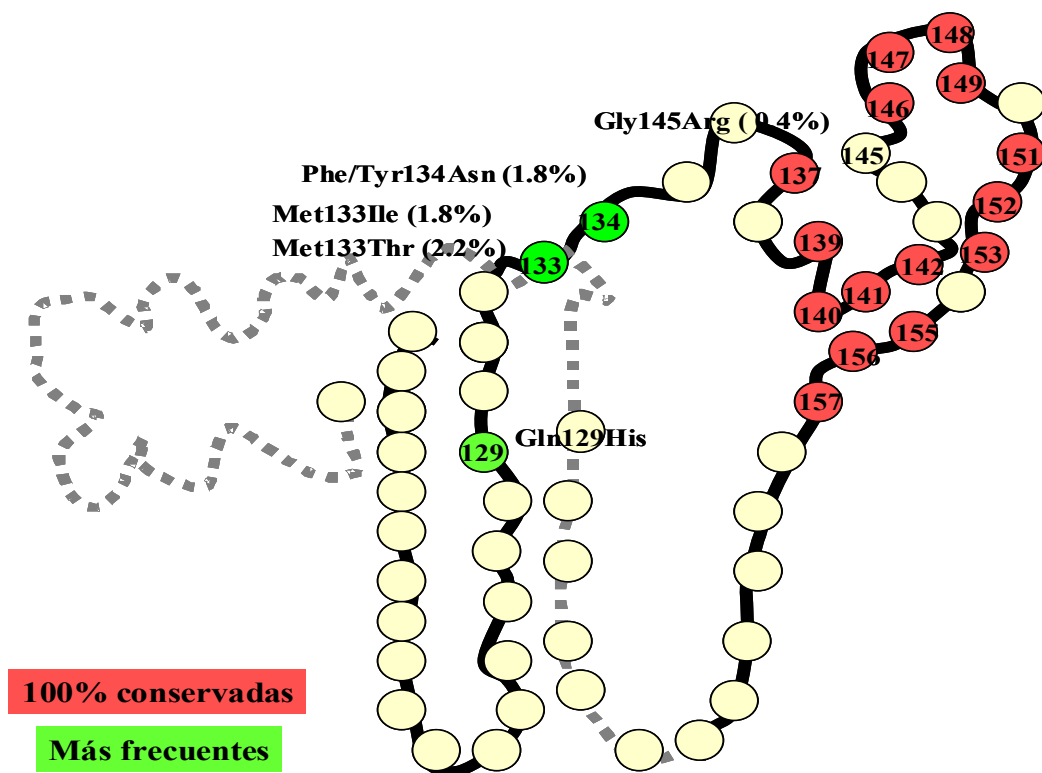


Figura 1: Representación gráfica de la posición de los aminoácidos en posiciones 112 a 157 del Antígeno de superficie del VHB. Se señalan en rojo las posiciones 100% conservadas y en verde las mutaciones encontradas con más frecuencia.

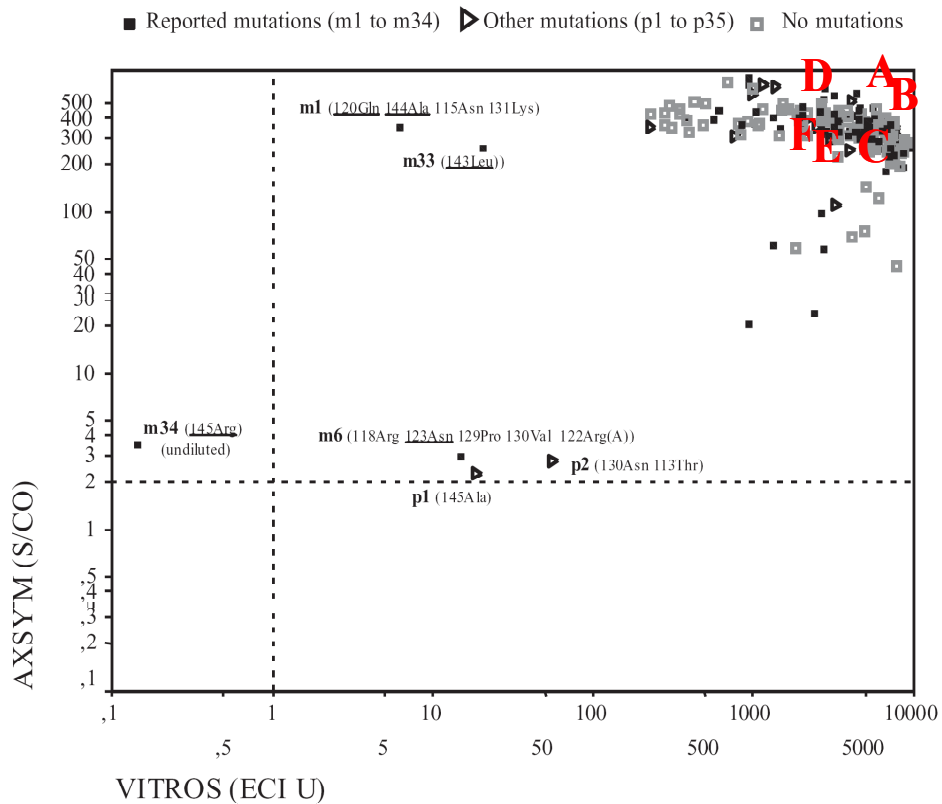


Figura 2: Gráfico de dispersión de los valores encontrados en la determinación de AgHBs por dos de los tres sistemas comerciales ensayados. Se representan tanto las muestras con mutaciones (cuadrado negro y triángulo) como aquellas sin ninguna mutación (cuadrado gris). Se detallan las mutaciones en aquellas que salen del cuadrante superior derecho del gráfico.

Tabla 1: Detalle de los resultados de los 3 tests ensayados en las 34 muestras con una o varias mutaciones (m1-m34) y en las tres muestras con mutaciones que no aparecen en la literatura pero que dan valores bajos en la detección de AgHBs en nuestro estudio.

Id.	Mutaciones	Método de detección del AgHBs (dilución)			Genotipo/subtipo
		Vitros (1:1)	AxSYM (1:40)	Auszyme (1:10)	
m1	120Gln 144Ala 115Asn 131Lys	Positivo débil	Positivo	Positivo débil	A/adw2
m2	126Ser 134L 118Met 130Asn 131Ala	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw3
m3	130Arg 120Gln 122Lys(D)	Positivo	Positivo	Positivo	D/adw3
m4	133Thr 134Leu	Positivo	Positivo	Positivo	A/adw2
m5	116Ser 118Arg 138Arg 143Trp	Positivo	Positivo	Positivo	E/ayw4
m6	118Arg 123Asn 129Pro 130Val 122Arg(A)	Positivo débil	Positivo débil	Positivo débil	A/ayr
m7	118Ser 116Pro	Positivo	Positivo	M.I.	D/ayw4
m8	120Ser	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw2
m9	120Thr 122Lys(D) 143Thr(D)	Positivo	M.I.	M.I.	D/ayw3
m10	120Thr	Positivo	Positivo	Positivo	A/adw2
m11	120Thr 126Ala 122Arg(A)	Positivo	Positivo	M.I.	A/ayw1
m12	122Asn 130Ser	Positivo	Positivo	Positivo	A/a-w
m13	126Ile 118Pro	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw2
m14	126Asn	Positivo	Positivo	Positivo	A/adw2
m15	130Arg	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw2
m16	133Ile	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw3
m17	133Ile 122Ile	Positivo	Positivo	Positivo débil	D/a-w
m18	133Ile 134His	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw3
m19	133Ile 134Arg	Positivo	M.I.	M.I.	D/ayr
m20	133Ile 144Ala	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw2
m21	133Thr	Positivo	M.I.	M.I.	D/ayw2
m22	133Thr 115Asn 134Lys	Positivo	M.I.	Positivo	D/ayw4
m23	133Thr 130Ser 131Asn(D)	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw2
m24	133Thr 144Gly 145Ala 122Arg(A) 131Arg(A)	Positivo	Positivo	M.I.	A/ayw1
m25	133Thr 154Pro	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw2
m26	134Leu	Positivo	Positivo	M.I.	D/ayw3
m27	134Leu	Positivo	Positivo	M.I.	A_adw2
m28	134Asn	Positivo	Positivo	M.I.	D/ayw2
m29	134Asn	Positivo	Positivo	Positivo	D/ayw2
m30	134Asn 118Gly 154Pro	Negativo	M.I.	M.I.	D/ayw3
m31	134Asn 123Val	Positivo	Positivo	M.I.	D/ayw2
m32	134Asn 129Pro	M.I.	M.I.	Positivo	D/ayw4
m33	143Leu	Positivo débil	Positivo	Positivo	D/ayw2
m34	145Arg	Negativo	Positivo débil	Negativo	D/ayw2
p1	145Ala	Positivo débil	Positivo débil	M.I.	D/ayw3
p2	130Asn 113Thr	Positivo débil	Positivo débil	Positivo	C/adrq-
p3	130Asn	Positivo débil	M.I.	Positivo débil	A/adw2

Bibliografía

1. Gonzalez R, Echevarria JM, Avellon A, Barea L, Castro E. Acute hepatitis B virus window-period blood donations detected by individual-donation nucleic acid testing: a report on the first two cases found and interdicted in Spain. *Transfusion* 2006;46(7):1138-42.
2. Gerlich WH. Diagnostic problems caused by HBsAg mutants-a consensus report of an expert meeting. *Intervirology* 2004;47(6):310-3.
3. Liu CJ, Kao JH, Shau WY, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. Naturally occurring hepatitis B surface gene variants in chronic hepatitis B virus infection: correlation with viral serotypes and clinical stages of liver disease. *J Med Virol* 2002;68(1):50-9.

4. Roznovsky L, Harrison TJ, Fang ZL, Ling R, Lochman I, Orsagova I, et al. Unusual hepatitis B surface antigen variation in a child immunised against hepatitis B. *J Med Virol* 2000;61(1):11-4.
5. Carman WF, Van Deursen FJ, Mimms LT, Hardie D, Coppola R, Decker R, et al. The prevalence of surface antigen variants of hepatitis B virus in Papua New Guinea, South Africa, and Sardinia. *Hepatology* 1997;26(6):1658-66.
6. He C, Nomura F, Itoga S, Isobe K, Nakai T. Prevalence of vaccine-induced escape mutants of hepatitis B virus in the adult population in China: a prospective study in 176 restaurant employees. *J Gastroenterol Hepatol* 2001;16(12):1373-7.
7. Oon CJ, Lim GK, Ye Z, Goh KT, Tan KL, Yo SL, et al. Molecular epidemiology of hepatitis B virus vaccine variants in Singapore. *Vaccine* 1995;13(8):699-702.
8. Leon P, Pozo F, Echevarria JM. Detection of hepatitis B virus variants resistant to lamivudine and famciclovir among randomly selected chronic carriers from Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004;22(3):133-7.
9. Avellon A, Echevarria JM. Frequency of hepatitis B virus 'a' determinant variants in unselected Spanish chronic carriers. *J Med Virol* 2006;78(1):24-36.
10. Echevarria JEaA, A. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Spain: identification of viral genotypes and prediction of antigenic subtypes by sequencing of a fragment from the S gene. Submitted.