

***VI Congreso Grupo Cooperativo Ibero
Americano de Medicina Transfusional
GCIAMT***

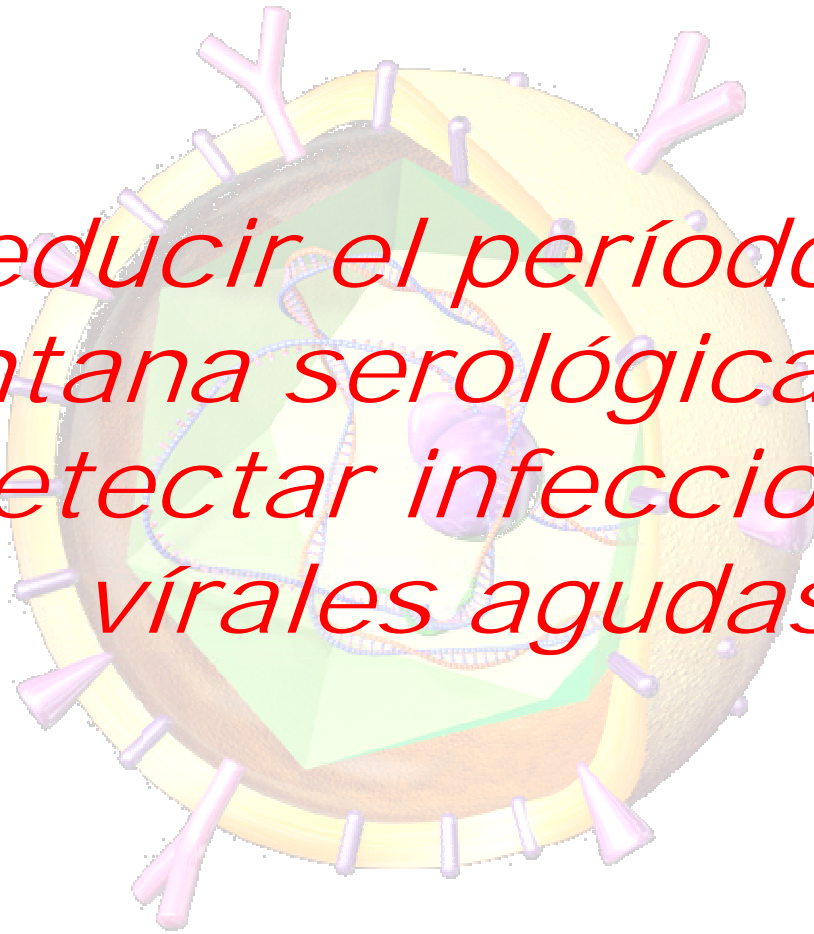


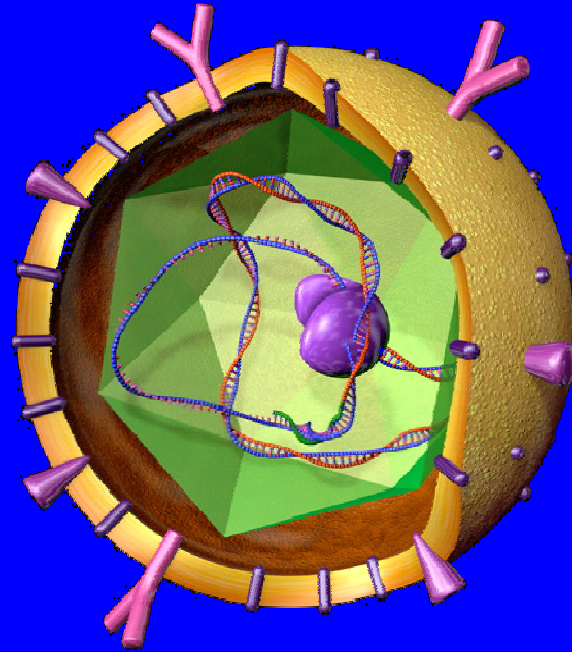
**Subtipos de los
Virus Hepatitis B y C**

Lic. TM Alejandro Retamal Salazar

Objetivo

*reducir el período de
ventana serológica para
detectar infecciones
víricas agudas*

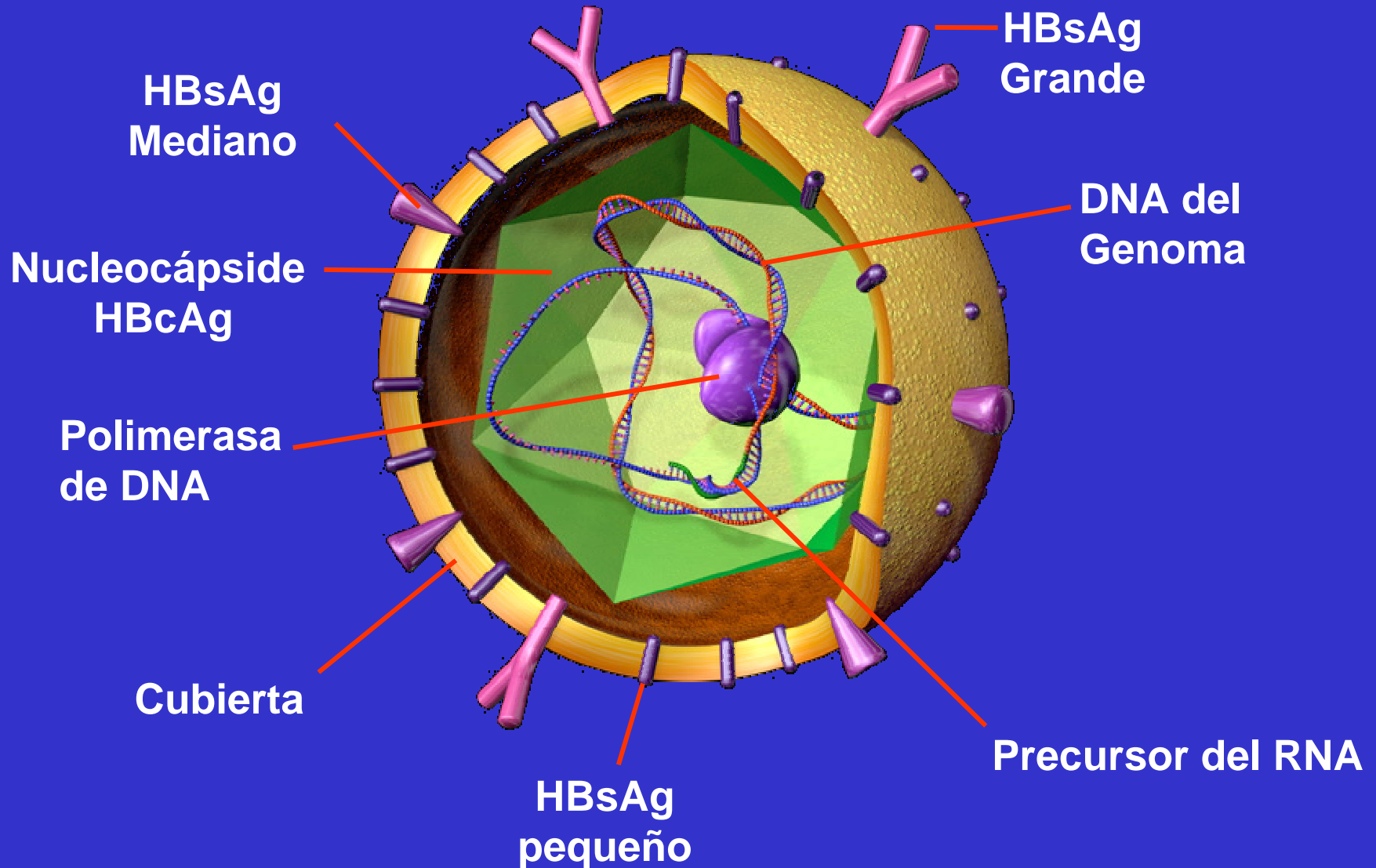




VIRUS
HEPATITIS B

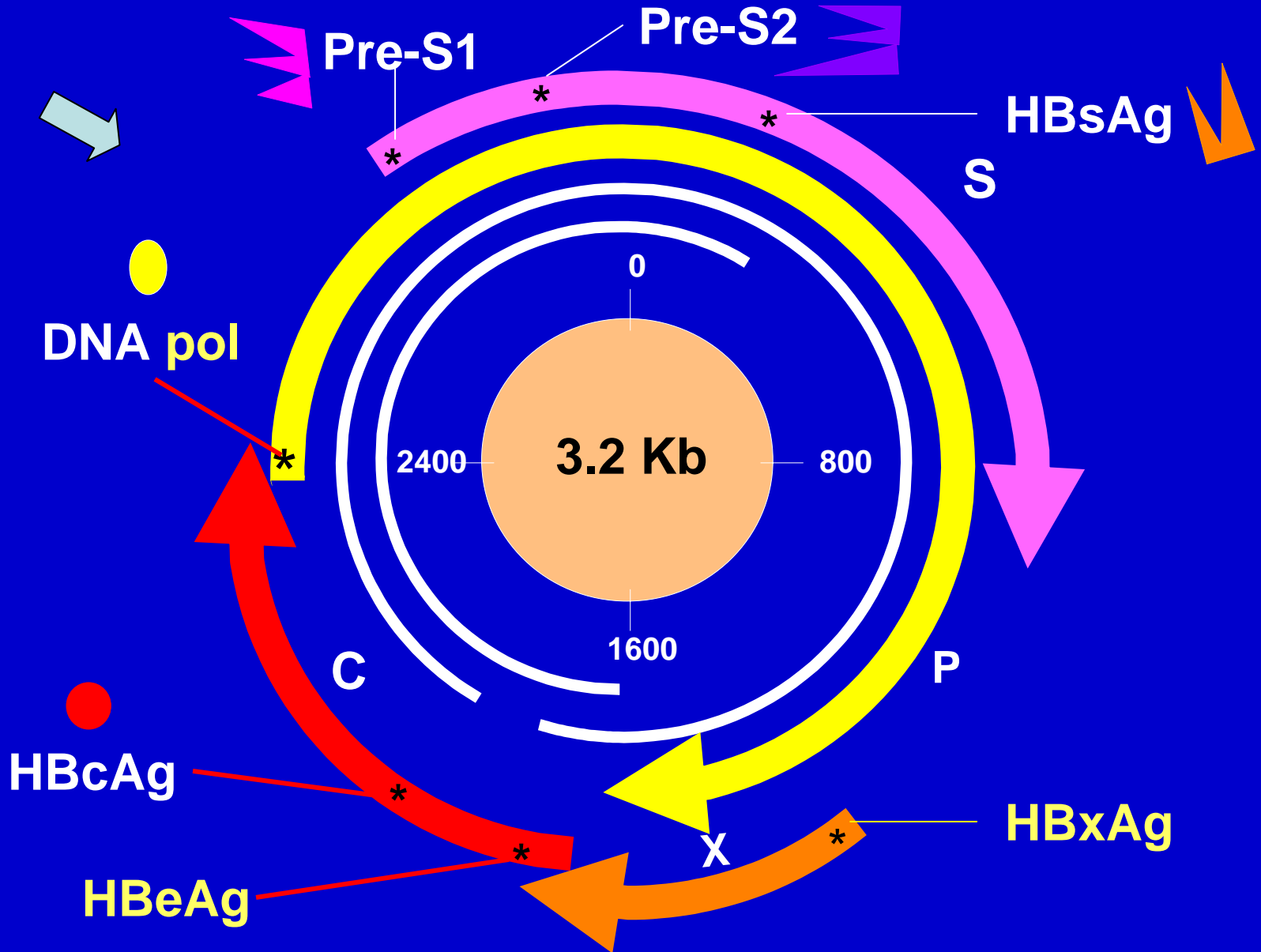
Estructura del Virus de la Hepatitis (VHB)

Partícula Dane de 41 nm



ESQUEMA DEL GENOMA DEL VHB

4
O
R
F
E



GENOMA DEL HBV

4
O
R
F

SHBs,
MHBs,
LHBs

AgHBs



DNA Polimerasa



AgHBc

AgHBe

Proteasas

doble función:
HBcAg-Pol
molde genomas

pgARN

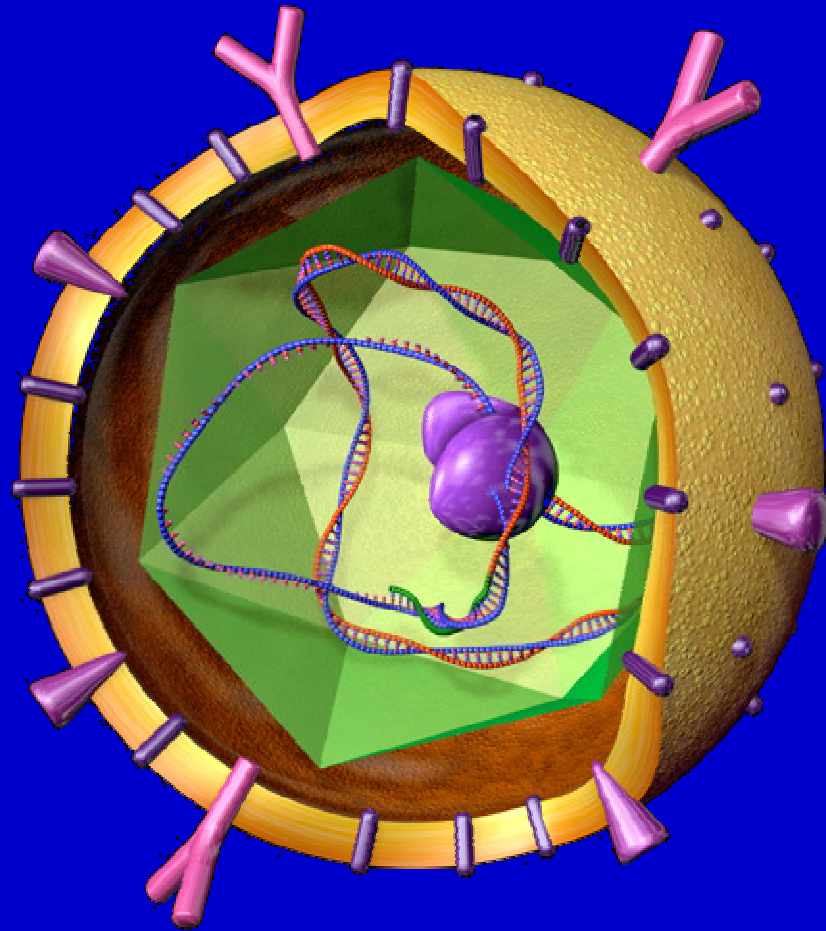
pcARN (3.5 kb)



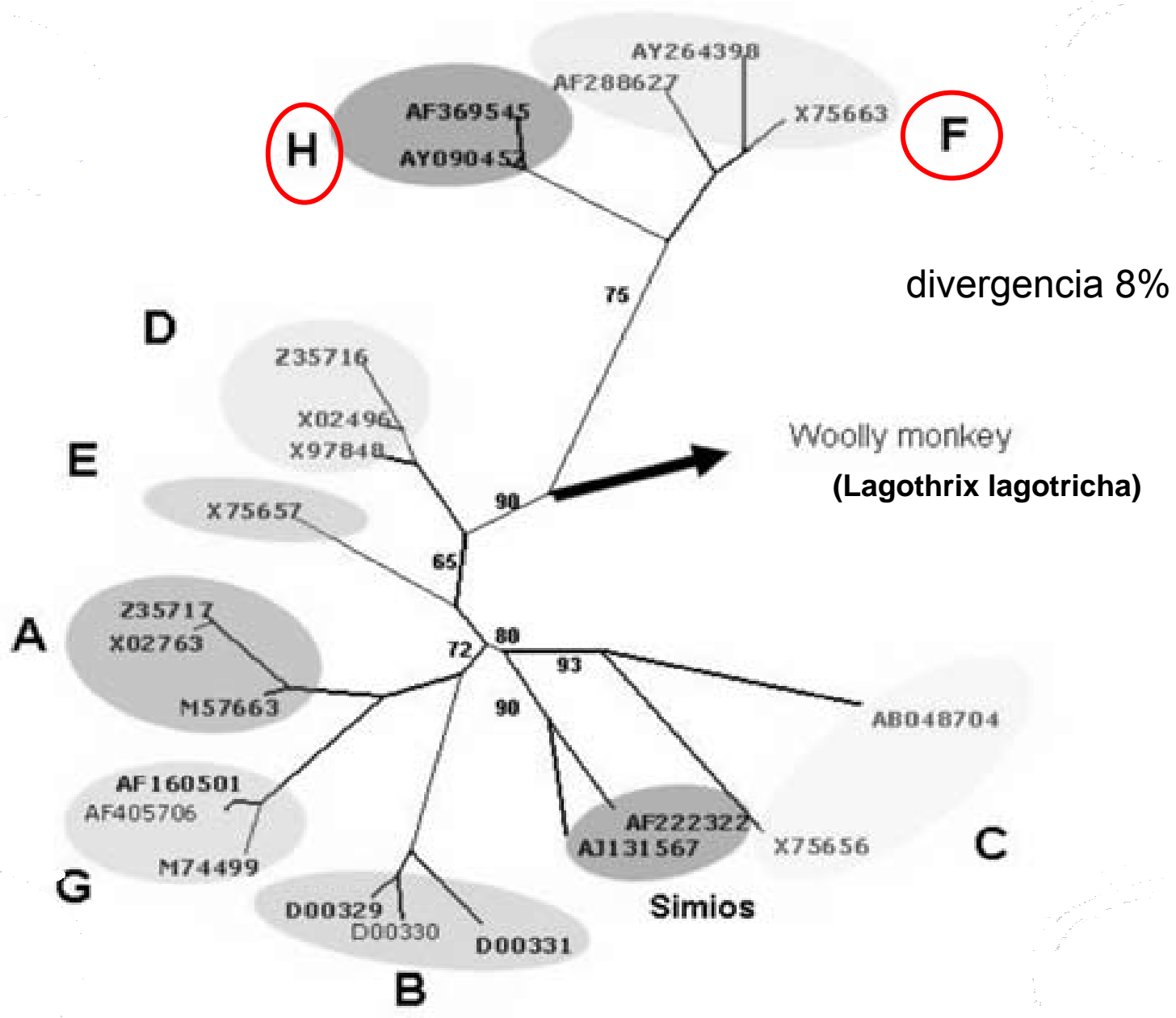
Epsilon

AgHBx





GENOTIPOS VHB



Clasificación VHB*

Genotipo	Subtipo	Distribución geográfica
A	<i>adw2, ayw1</i>	<i>Noroeste de Europa, Norteamérica y África Central</i>
B	<i>adw2, ayw1</i>	<i>Sudeste de Asia, China y Japón</i>
C	<i>ayr, adr_q+, adr_q- adw2</i>	<i>Sudeste de Asia, China y Japón</i>
D	<i>ayw2, ayw3</i>	<i>Sur Europa, Oriente Medio e India</i>
E	<i>ayw4</i>	<i>África</i>
F	<i>adw4_q-</i>	<i>Nativos americanos, Polinesia, América Central y Sur</i>
G	<i>adw2</i>	<i>Francia y Estados Unidos</i>
H	<i>adw4_q-</i>	

**según diferencias serológicas*

a: región antigénica muy conservada presente en los 3 tipos de HBsAg

d/y: presencia de Lis o Arg (122) de HBsAg

w/r: presencia de Lis o Arg (160) de HBsAg

w1-4: identidad del AA en 127(Pro w1/2)(Tre w3) y (Leu w4)

q-: AA (Ala) y (Gln) en posición 177 y 178

Estructura antigénica del AgHBs

La envoltura del HBV contiene 3 proteínas (complejo AgHBs)

SHAgHBs con 226 aa

MHAgHBs con 281 aa

LHAgHBs con 345 aa

Codificadas por el gene S del genoma viral

Regiones

S

S/pré-S1

S-pré-S1/pré-S2

Región hidrofílica globular: aas 99 a 169 del SHAgHBs



DETERMINANTE ANTIGÊNICO “a”

aas 121 – 149 de la región S

Determinante Antigénico “a”

- ✓ Es común a todos los sub-tipos del HBV
- ✓ Tienen afinidad con el determinante “a”
 - Acs contra el AgHBs en la infección por el HBV
 - Acs después de la vacunación
 - Acs de los kits diagnósticos para la detección de AgHBs

HBV – AgHBs – Subtipos y Genótipos

- AgHBs posee diversas proteínas
 - Determinantes antigenicos (a, d, y, w, r)
 - Combinaciones: subtipos
 - » **Más comunes: adw, adr, ayw.**
 - El determinante antigénico "a" es comun a todos los subtipos
- Basados en la divergencia genética del 8%, o más, de la secuencia completa de nucleótidos
 - **Genótipos: A, B, C, D, E, F, G, H**
- Mutantes

Prevalence of Hepatitis B carriers

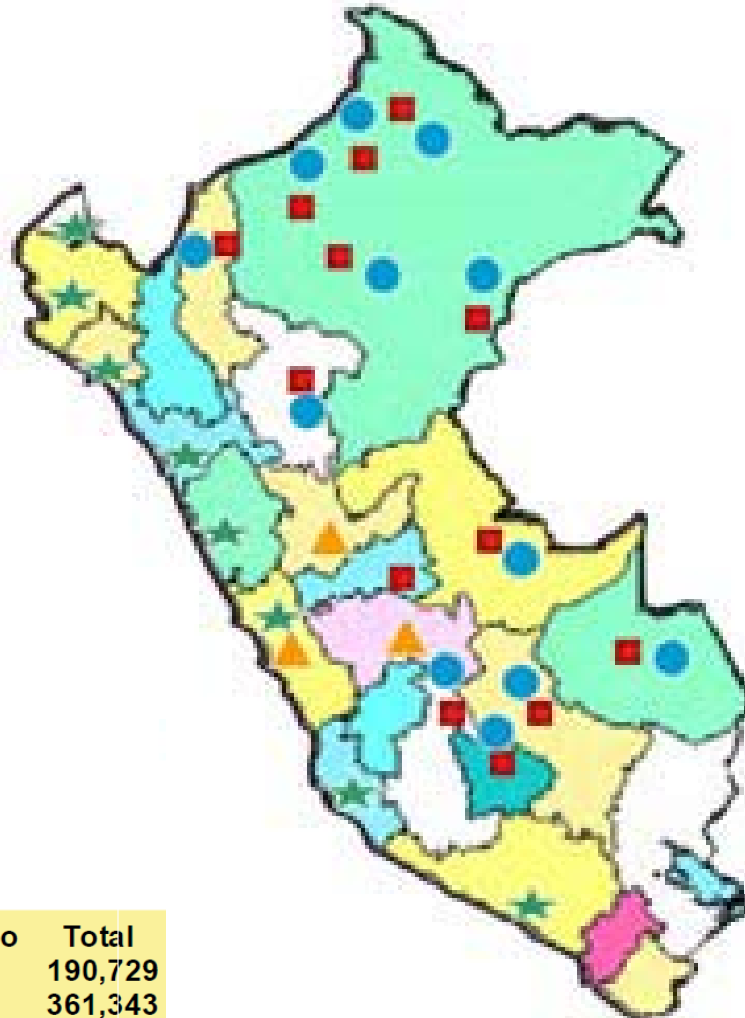


Figure 66-9. Worldwide prevalence of hepatitis B carriers and primary hepatocellular carcinoma. (Courtesy Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta.)

Distribución Geográfica del VHB



VHB en el Perú

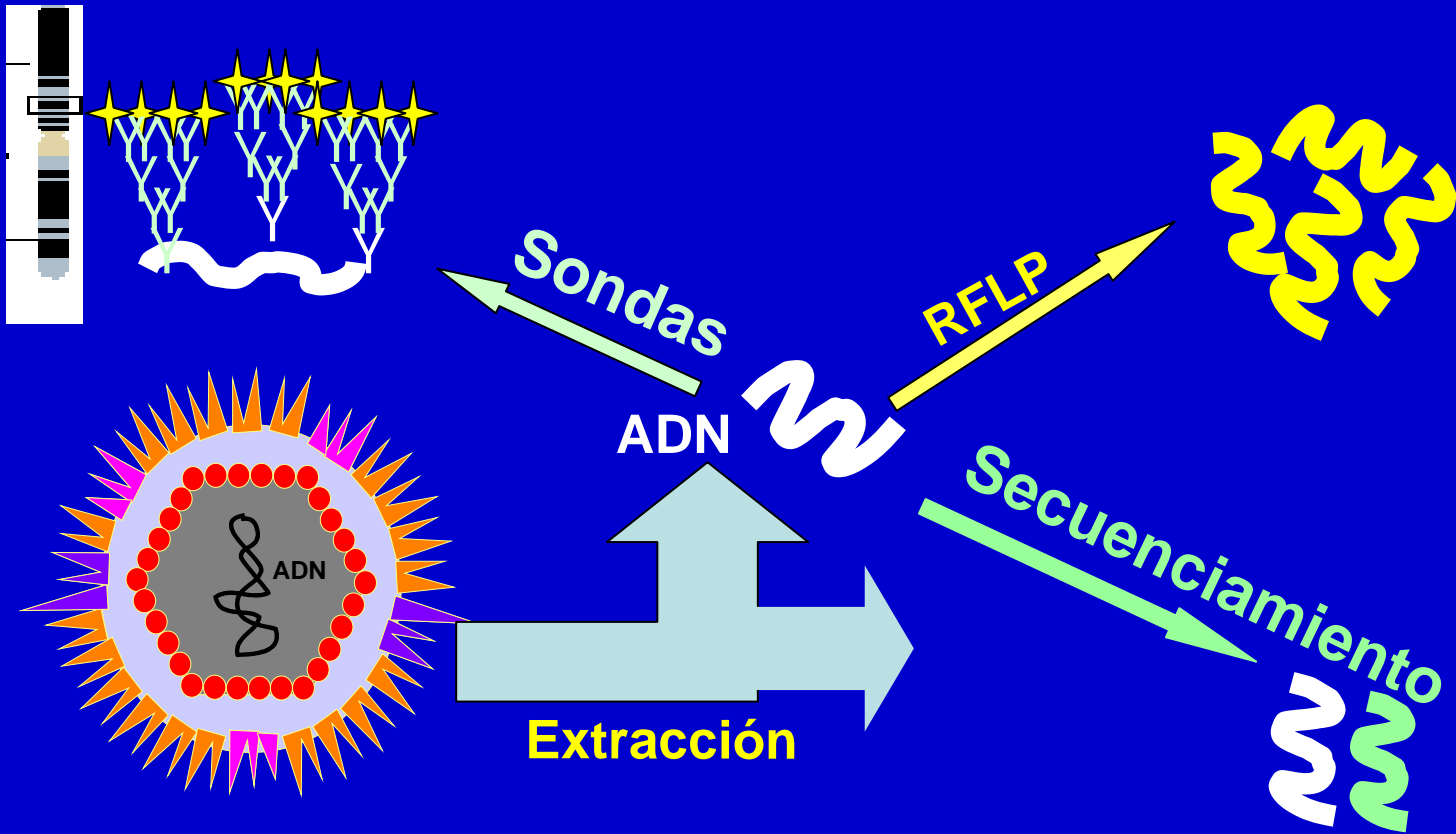


- Alta Endemicidad HBsAg > 8%
- ▲ Mediana Endemicidad HBsAg 2-7%
- ★ Baja Endemicidad HBsAg < 1%
- Hepatitis Delta

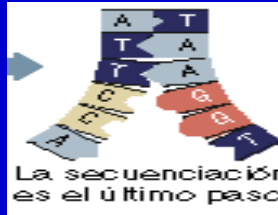
Zona de riesgo	< 1 año	1 - 4 año	Total
Zona hiperendémica	43,382	147,346	190,729
Zona de mediana endemicidad	77,048	284,296	361,343
			552,072

Cabezas, C. Rev Med Esp

Estudio del Genoma VHB



ADN



HVB. Subtipos y Genotipos

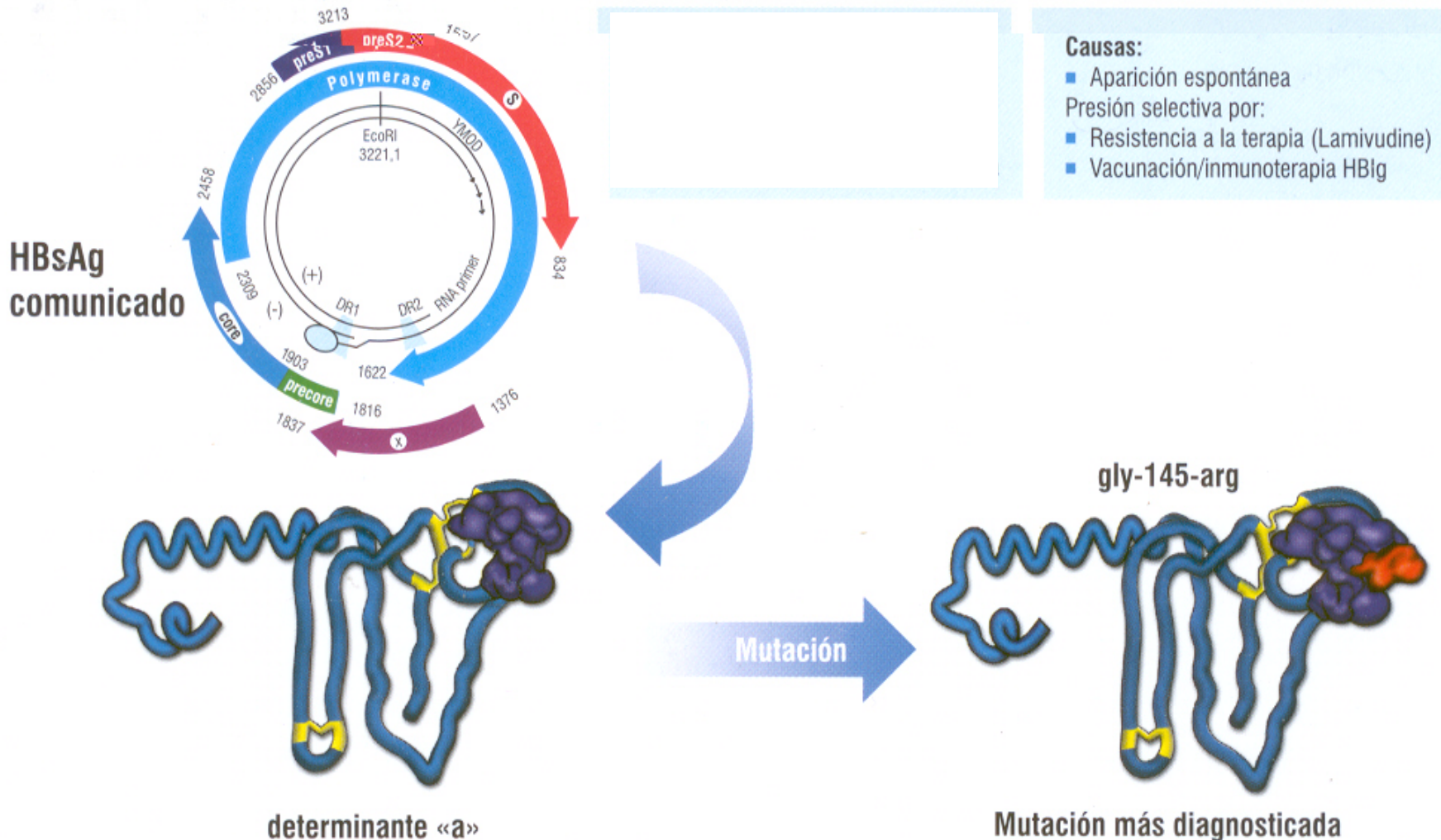
- Las diferencias en genotipos (>8% de secuencias genómicas) podrían explicar aspectos patogénicos los cuales se han relacionado con peculiaridades geográficas:
 - Asociación con nivel de carga viral
 - Tasa de seroconversión del HBeAg
 - Patrones de mutación en regiones precore y core
 - Capacidad de transmisión vertical
 - Potencialidad oncogénica
 - Suceptibilidad a inmunidad inducida por vacunas
 - Coevolución con el virus de hepatitis delta genotipo III (infecciones severas)

HBV: Replicación y Mutaciones

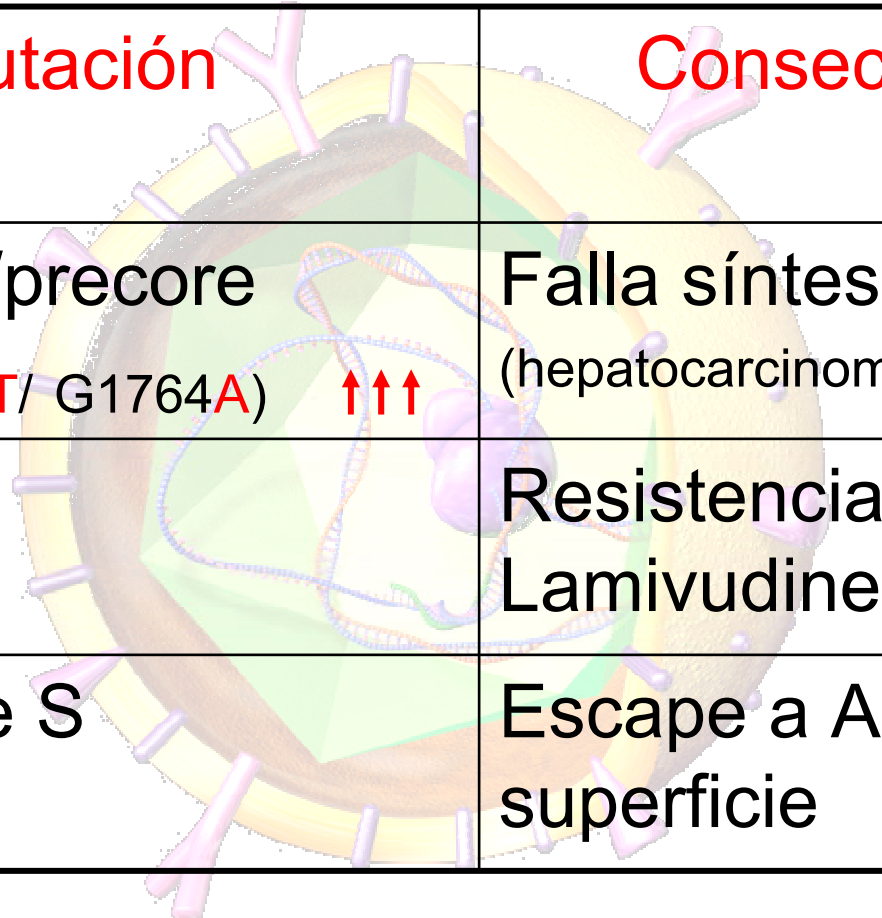
- ✓ Replica su genoma (DNA) via transcripción reversa del RNA pre-genómico
 - Inserción incorrecta de nucleotídeos en el cDNA
 - Genera “quasiespecies”
 - Alta replicación viral: 10^{12-13} por día
 - Alta tasa de mutaciones

Variabilidad del VHB

Figura 1: Formación de la mutación en el HBsAg



Mutaciones más frecuentes



Mutación	Consecuencias
Gen core/precore BCP (A1762T/ G1764A) ↑↑↑	Falla síntesis HBeAg (hepatocarcinoma, h fulminante)
Gen pol	Resistencia al Lamivudine
Gen S/pre S	Escape a Acs de superficie

Mutaciones VHB

G1896A <i>precore/core</i>	HBeAg <i>prob síntesis</i> <i>codon stop (UAG)</i>	B, C y D
codones 1856, 1898 y 1899	Idem	Idem
Liang et al (1990)	Ningún Ag viral	
proteína S, en posición 145		No protección por Ac AntiHBs (vacunación)
YMDD		Resistencia a lamivudina
N236T		Resistencia Adefovir

C Peor pronóstico

Variantes del HBV

- ✓ Los subtipos y genótipos del HBV se originan de forma natural durante el curso de la infección por el HBV
 - Consolidadas en la naturaleza
 - Presentan distribución étnica y geográfica características

Mutantes del HBV

- 1. Generados espontaneamente durante el curso de la infección natural por el HBV**
- 2. Generados en un ambiente de presión selectiva**
 - Uso de inmuno profilaxis activa
 - Uso de inmuno profilaxis pasiva
 - Terapia con anti-virales

Principales Mutantes del HBV

- ✓ **Mutantes pré-Core o Core promoter**
 - Encontrados en cepas más virulentas
- ✓ **Mutantes en el gene P (polimerasa)**
 - Resistencia a anti-virales
- ✓ **Mutantes en el gene X**
 - Asociados al desarrollo de hepatocarcinoma
- ✓ **Mutantes en el gene S**
 - Modifican los epítomos inmunodominantes del determinante antigénico “a”

Mutaciones importantes en 8/11 aislados provenientes de donantes con infección residual por VHB

Nº Donante	AgsHB	Pre-cápside	Cápside
288			Delección ^{aa.41-51}
			C. terminación ^{aa.99}
155	Y100C	precore ^{nt.1816}	
		sinonim.y no sinon.	
282	Y100C		
290	Y100C		
7	Y100C	precore ^{nt.1816}	
		sinonim.y no sinon.	
7-2			Delección ^{aa.38-50}
262			cambia ML ³⁶
14		sinonim.y no sinon.	

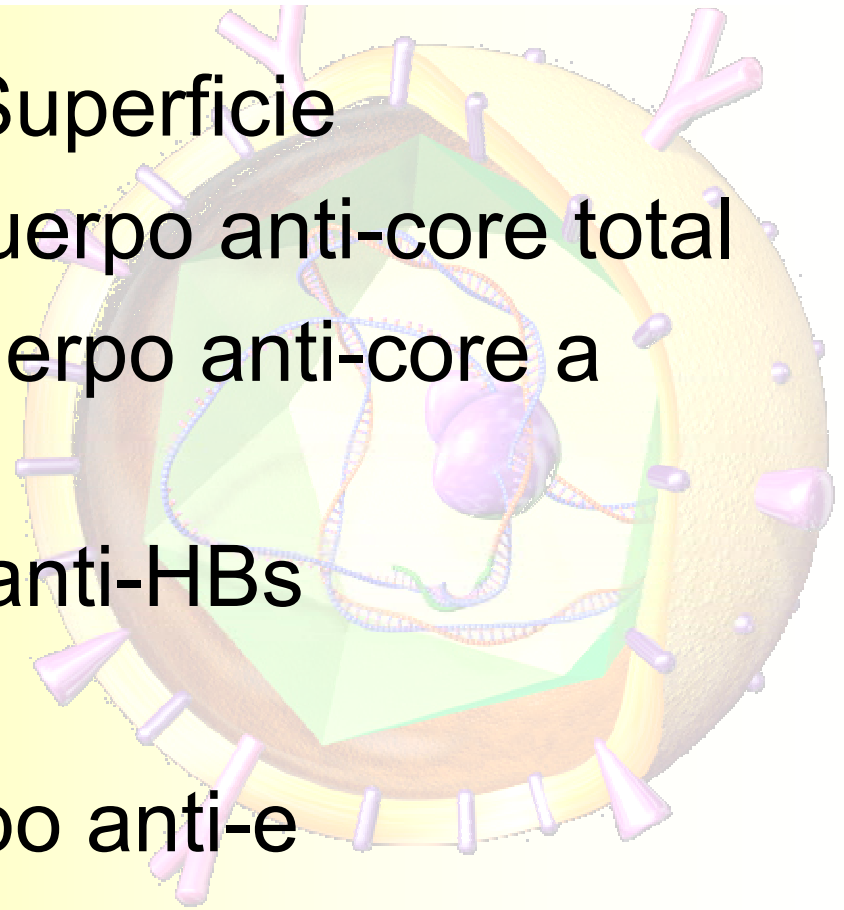
75% aislados con mutaciones sinónimas
 55% cepas con mutaciones no sinónimas.

Medicina Transfusional

- 
- **Importancia del Tamizaje Serológico en Donantes de Sangre**
 - **Interrumpir la transmisión del HBV por la transfusión de componentes sanguíneos**
 - **Tests recomendados**
 - **AgHBs**
 - **Anti-HBc (total)**

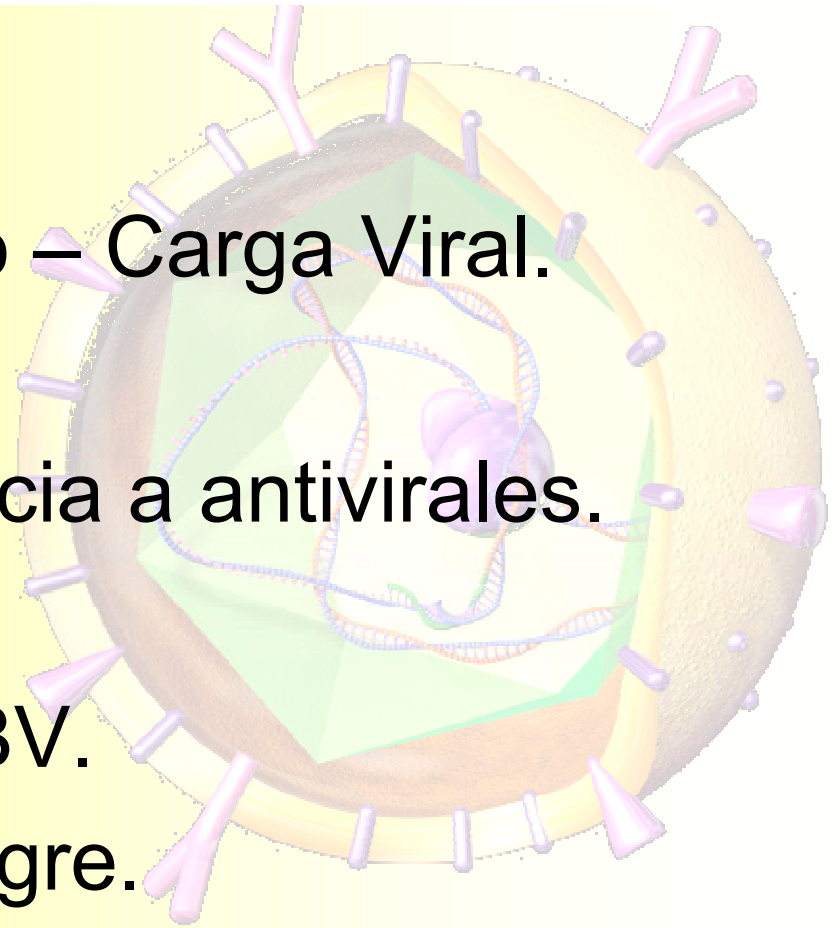
Marcadores Serológicos

- **HBsAg**: Antígeno de Superficie
- **Anti-HBc (total)**: Anticuerpo anti-core total
- **Anti-HBc (IgM)**: Anticuerpo anti-core a clase IgM
- **Anti-HBs**: Anticuerpo anti-HBs
- **HBeAg**: Antígeno e
- **Anti-HBeAg**: Anticuerpo anti-e



Marcadores moleculares

- HBV-DNA cualitativo.
- HBV-DNA cuantitativo – Carga Viral.
- Mutantes pre-Core.
- Mutantes de Resistencia a antivirales.
- Genotipos de HBV.
- Otras mutantes de HBV.
- TAN en banco de sangre.



Tamizaje Serológico de Donantes de Sangre para el HBV

- En la selección de los tests para AgHBs, dar preferencia:
 - A los que presenten mejor sensibilidad
 - Detección $<0,1$ ng de AgHBs /mL
 - A los que consigan detectar el mayor número de mutantes

Importancia del Anti-HBc en el tamizaje serológico de donantes de sangre

- Eliminar el riesgo residual de transmisión del HBV por transfusión
 - ✓ Tests AgHBs con baja sensibilidad
 - ✓ Niveles de AgHBs indetectables
 - ✓ Mutantes en el determinante "a" del HBV
 - ✓ Hepatitis B oculta

Importancia del Anti-HBc en el tamizaje serológico de donantes de sangre

- En regiones de baja prevalencia
 - ✓ Descarte del 2 al 5%
- En regiones de mediana y alta prevalencia para el AgHBs
 - ✓ El descarte puede llegar a más del 20%

Em regiones con baja prevalencia para el AgHBs, pero donde ocurra intensa transmisión horizontal en niños, el descarte por anti-HBc en donantes puede llegar al 10%

Alternativas en Regiones con Alta Prevalencia de Anti-HBc (+)

Aprovechar donantes anti-HBc (+)

Donantes anti-HBc (+) con anti-HBs >100 mUI/ml, podrian aceptarse

Donantes anti-HBc (+) con anti-HBs < 100 mUI/ml, solo se aceptarían si fuesen HBV-DNA Negativos

Controversia, porque la presencia de anti-HBs no siempre es indicativa de ausencia de HBV - DNA

Alternativas en Regiones con Alta Prevalencia de Anti-HBc (+)

Un estudio en India con 2.000 donantes mostró la presencia de Anti-HBc (+) en 131 (6,55%) siendo que 16 de los 131 (12,2%) eran HBV – DNA (+)

Si el anti-HBc es (+) la bolsa de sangre deberá ser descartada

Posteriormente el test para HBV-DNA puede ser adecuado para seguimiento de la infección por HBV

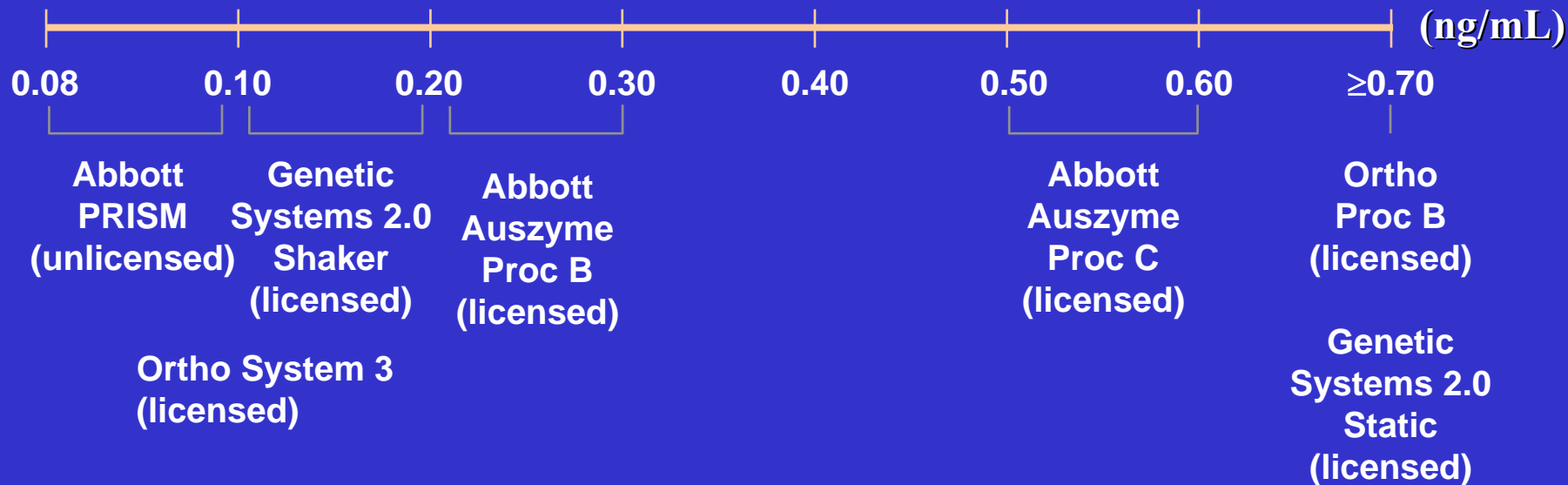
Alternativas en Regiones con Alta Prevalencia de Anti-HBc (+)

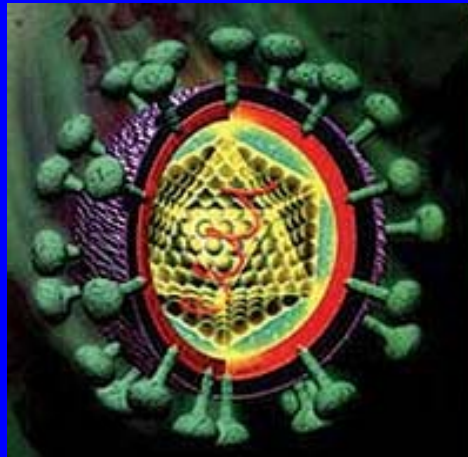
Conseguir un pool de donantes negativos para AgHBs y Anti-HBc y motivarlos a donar sangre regularmente

Vacunar los donantes con solo el anti-HBc (+) y verificar la seroconversión

Importar unidades de sangre de regiones con baja prevalencia de Anti-HBc

Differential Sensitivity of HBsAg Assays* Using Purified Standards





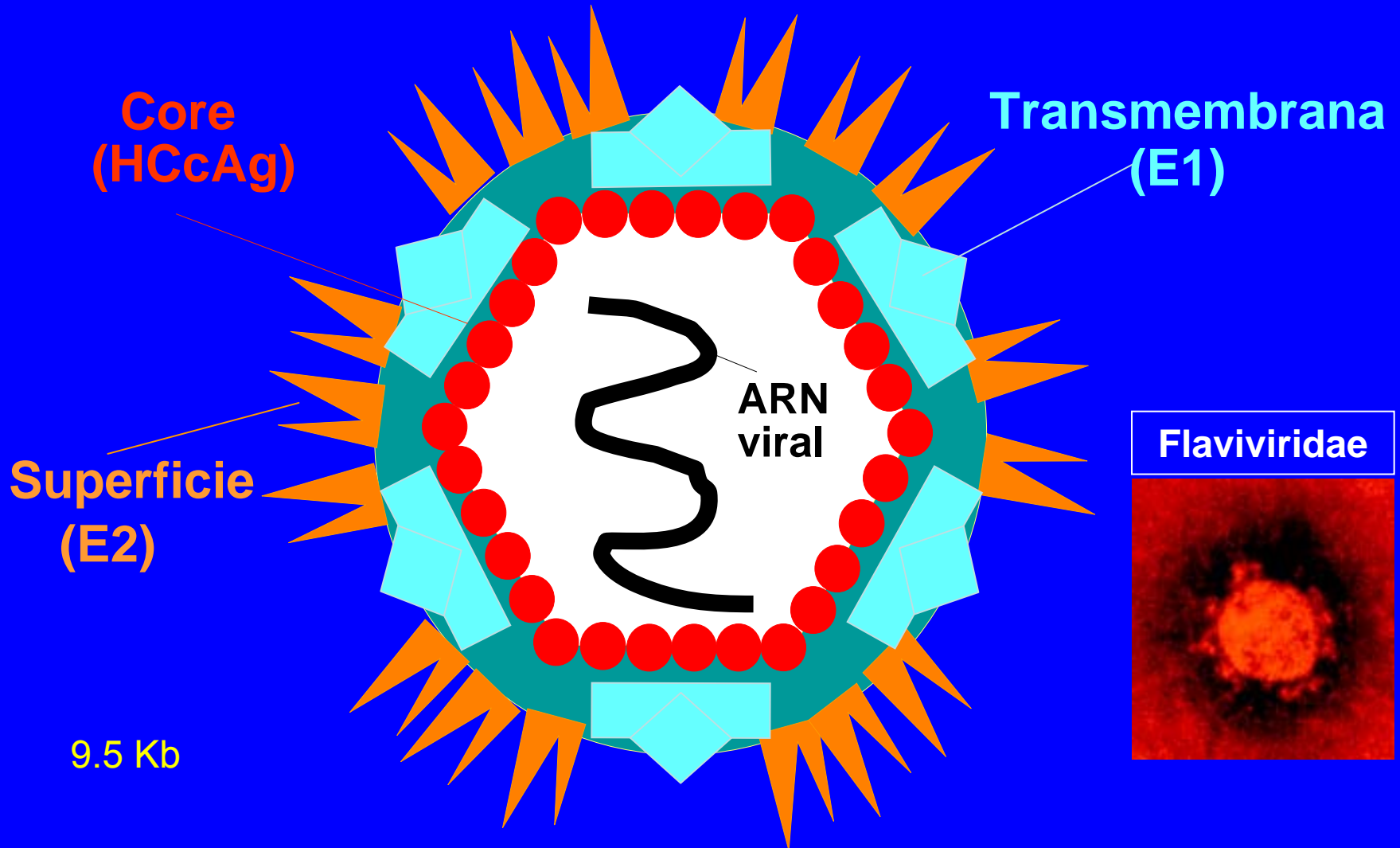
VIRUS HEPATITIS C

HEPATITIS C: VIAS DE TRANSMISION

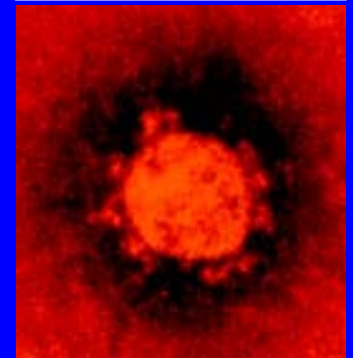
- Transfusional: 0.77%
- Parenteral: Hemofílicos – DEV (Coinfección HIV-HCV y HBV-HCV)
- Hemodialisis: 15 – 25%.
- Madre – hijo: Poco frecuente.
- Sexual: Baja efectividad.
- Por exposición accidental en empleados de salud: 1.8%.
- Por exposición a pinchaduras.
- No identificada: 10 – 30%.

ESQUEMA DEL VIRIÓN DEL VHC

50 nm

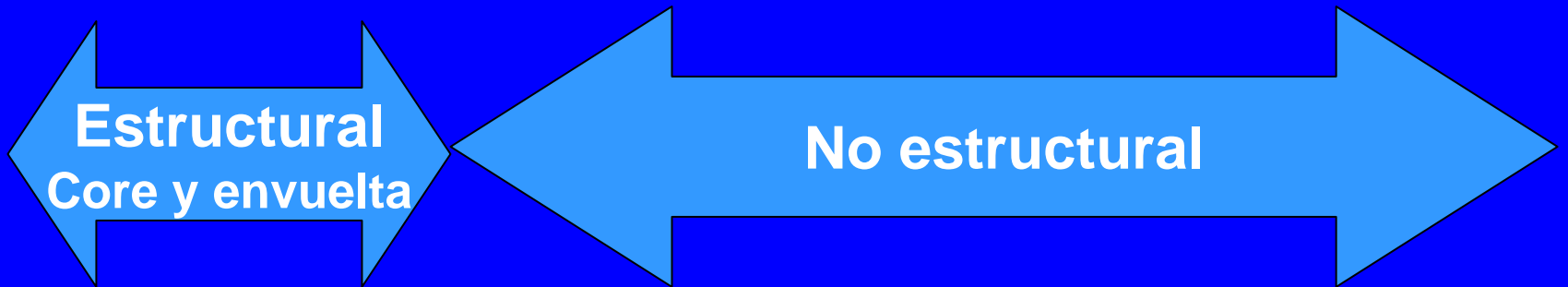
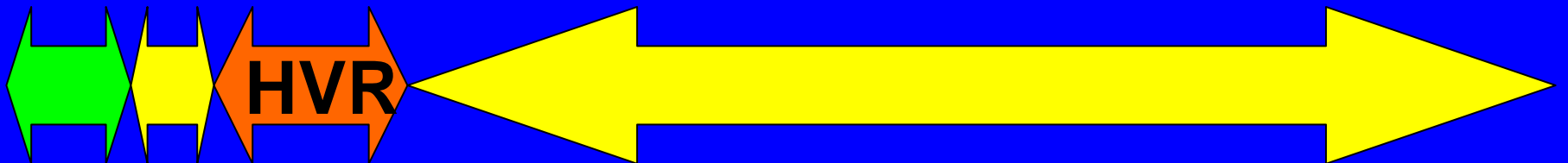
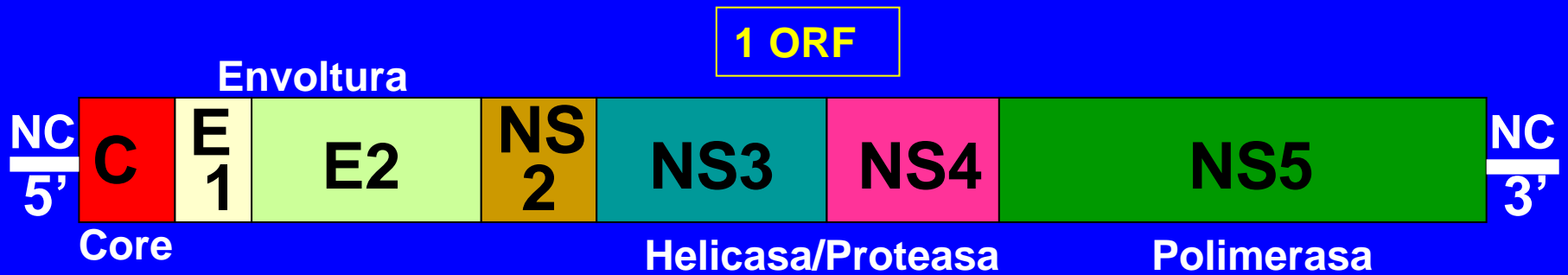


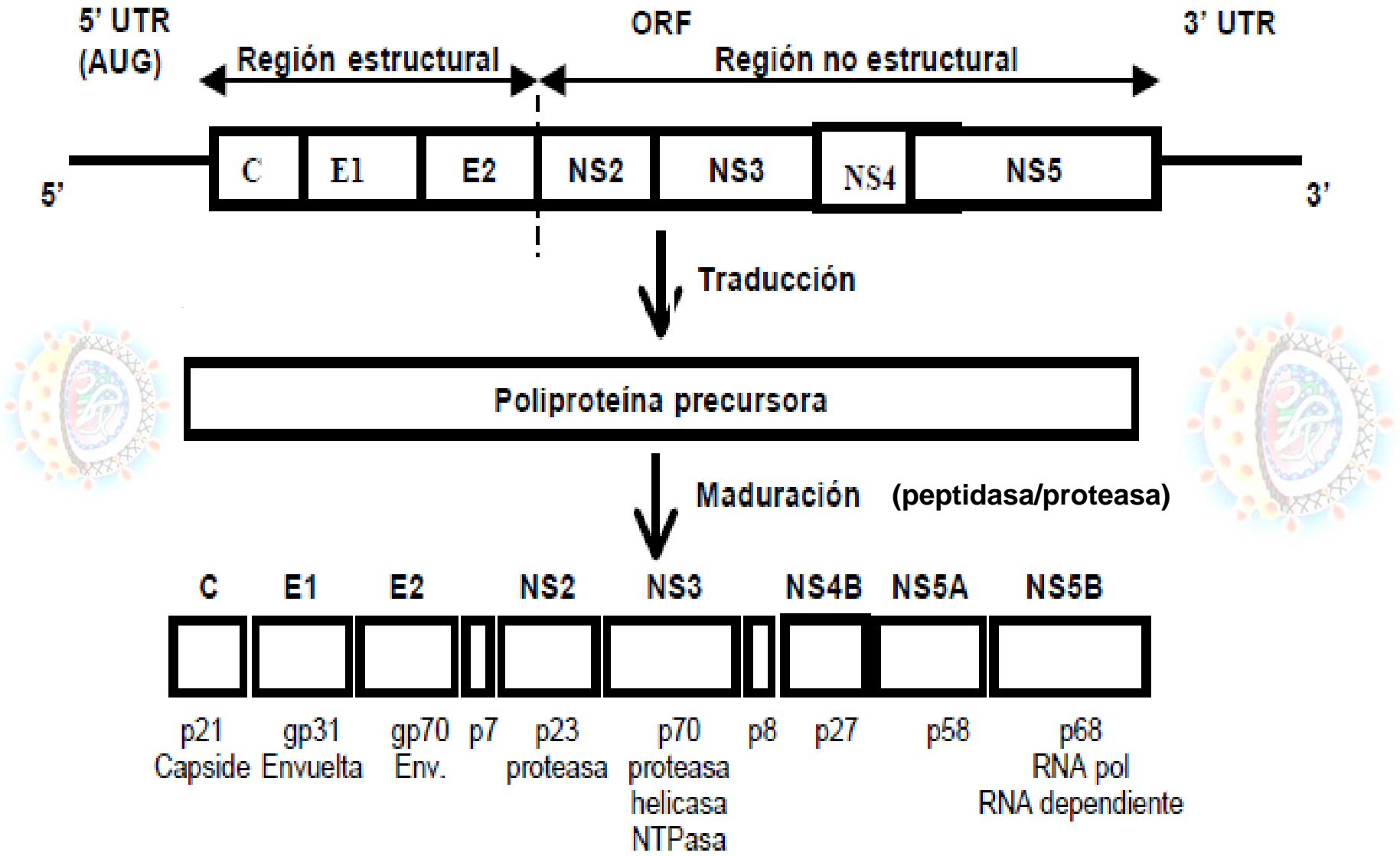
Flaviviridae



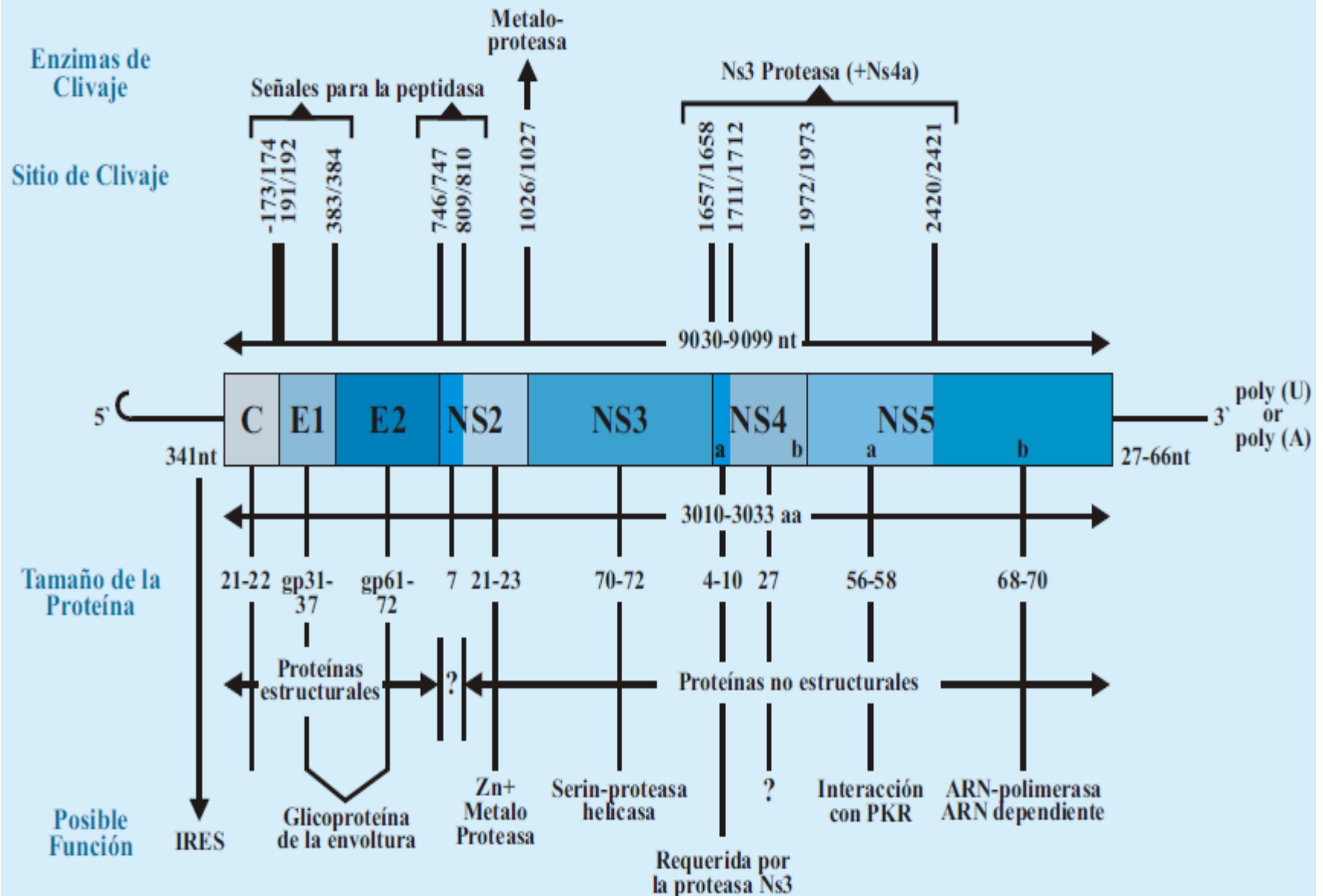
VIRUS DE LA HEPATITIS C

Proteínas y distribución de la variabilidad genética





dos regiones no codificantes del genoma (5'NCR y 3'NCR).

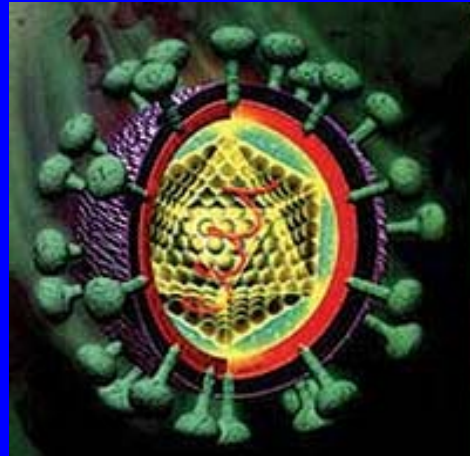


HETEROGENEIDAD HVC

- alta tasa de errores de la ARN polimerasa dependiente de ARN
- población de *quasi-especies* en un mismo individuo con genomas virales que difieren entre un 1-5% en su secuencia (Kato,2001)
- Tasa de Mutación
 $10^{-3} - 10^{-4}$ sustituciones /sitio de genoma/año

Mutantes

- partículas virales diferentes genéticamente:
 - un mecanismo rápido y eficiente para el escape del virus a la RI
- alta proporción de infecciones crónicas por el VHC
- principal obstáculo para el desarrollo de una vacuna



GENOTIPOS

HVC

GENOTIPOS

- La > variabilidad del genoma se encuentra hacia el extremo N-terminal de la E2, donde se encuentran las RHV (Hijikata y cols., 1991; Kato, 2001).
- Los VHC se separan en grupos filogenéticamente relacionados, llamados **subtipos**.
- Dentro de los genotipos se definen más de **90 subtipos** (1a, 1b..., 2a, 2b..., etc) con variaciones entre un 15 y un 30%

Variabilidad Genética

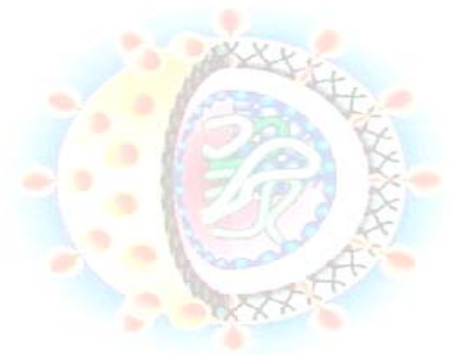
Categorías	Homología (%)
Genotipo	66-69
Subtipo	77-80
Aislado	91-95
Quasiespecies	>98

1 a_hcv1

1: genotipo

a: subtipo

hcv1 aislado

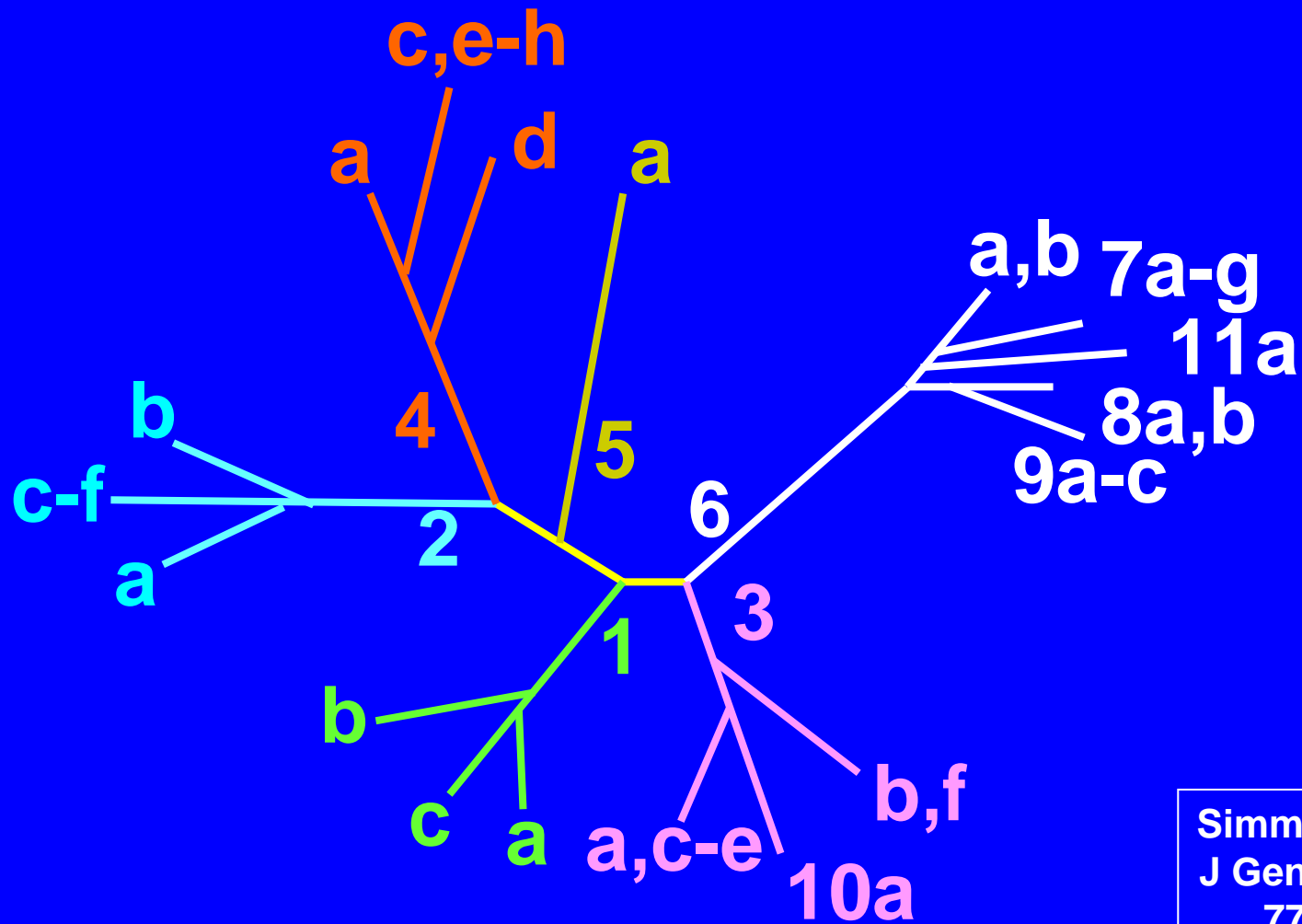


Diferencia entre Subtipos

- Diferencia de más de un 20% a nivel nucleotídico
- más de un 15% a nivel de AA
- la RNT 5' y la región que codifica para la proteína de la cápside muestran una elevada homología

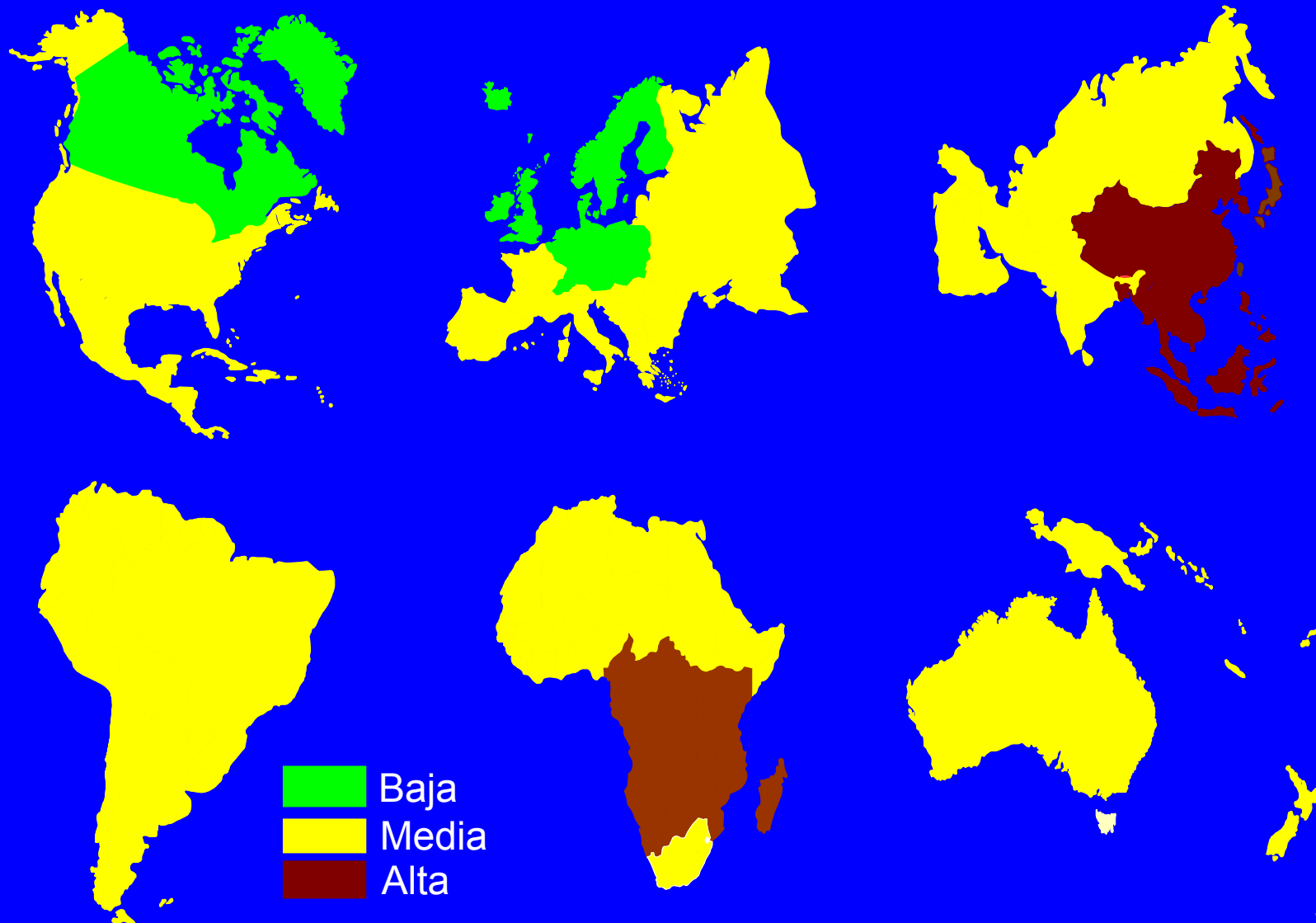
VIRUS DE LA HEPATITIS C

Filogenia y genotipos

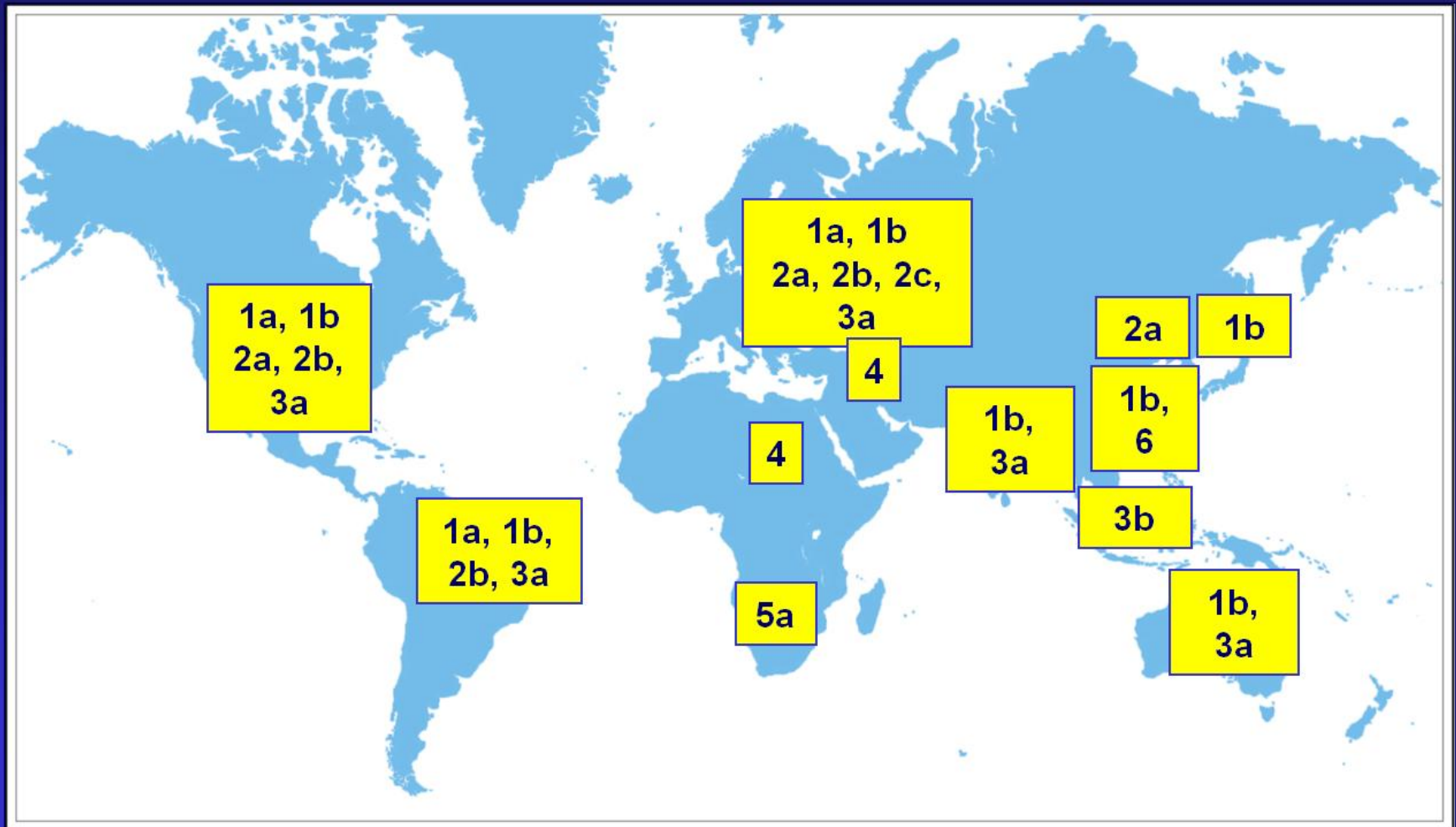


Simmonds et al.,
J Gen Virol 1996;
77:3013-24

PREVALENCIA DE LA HEPATITIS C

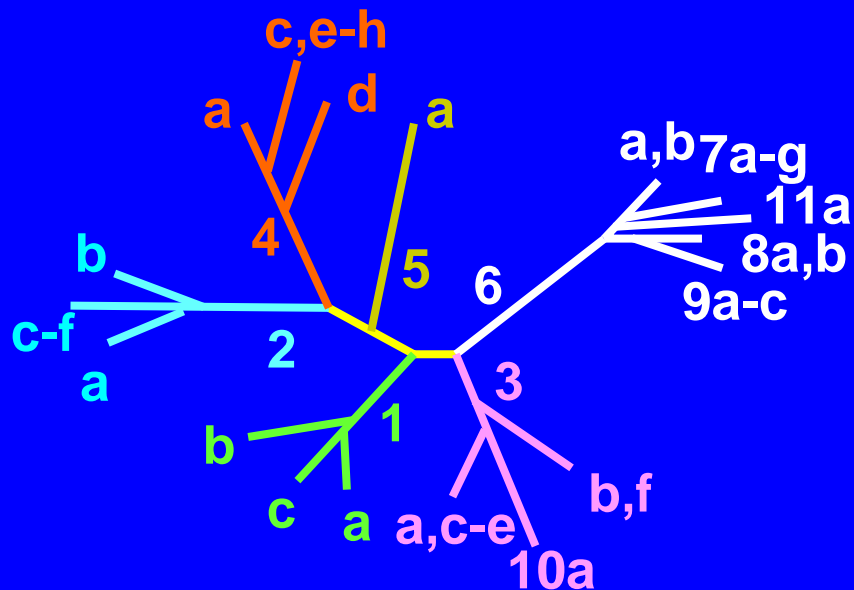
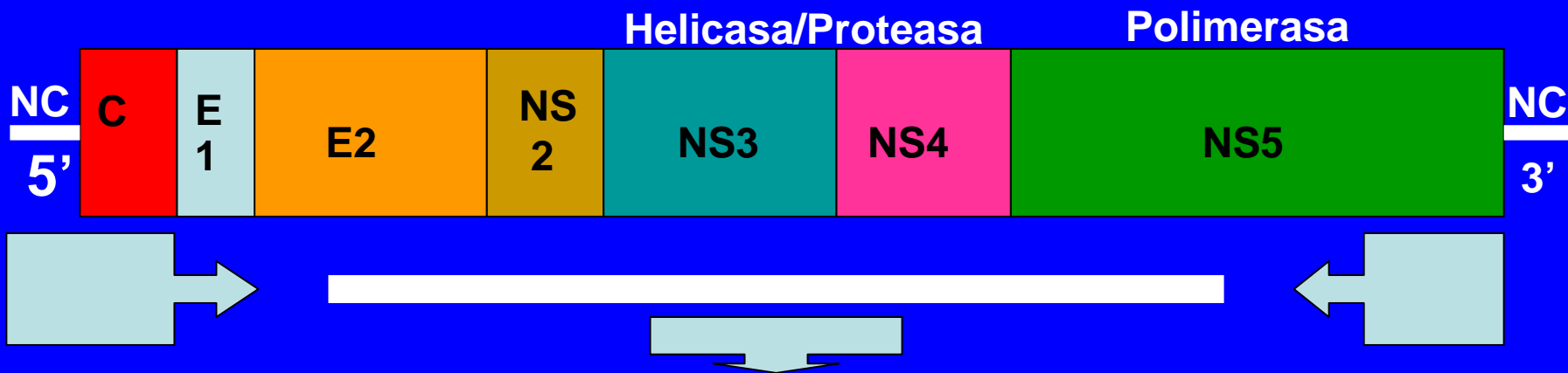


Distribución Geográfica de los Genotipos de HCV



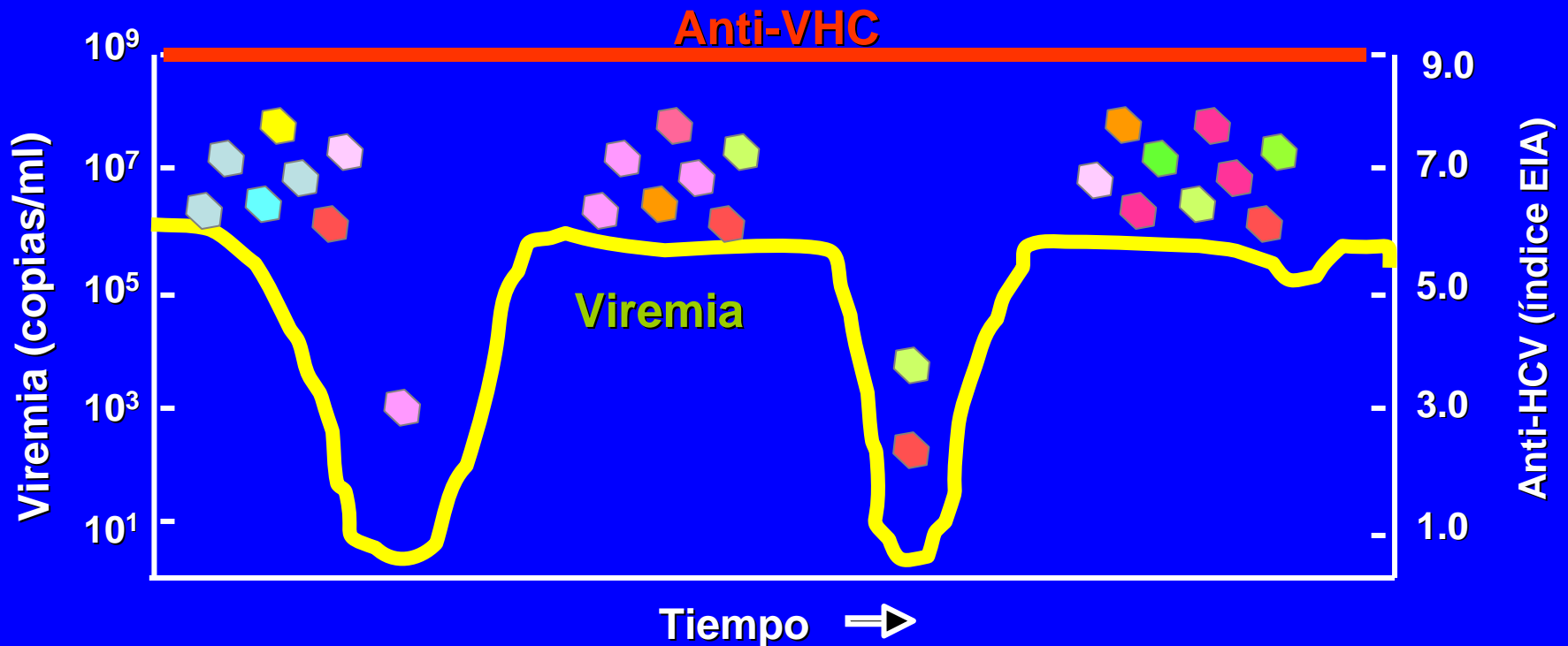
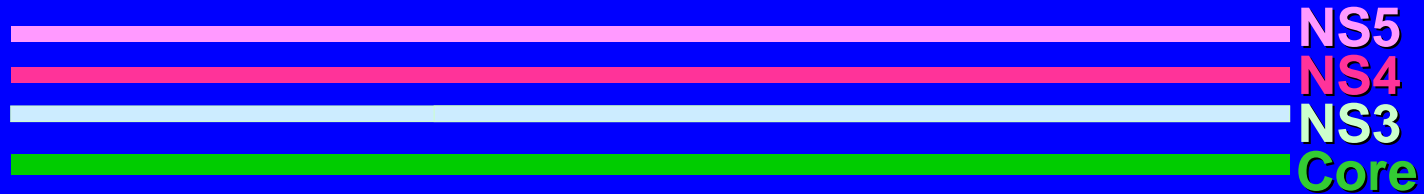
VIRUS DE LA HEPATITIS C

Genotipos identificados



INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC

Viremia y respuesta de anticuerpos



1 UI/ml = 5 copias/ml

DIAGNÓSTICO VHC

Marcadores serológicos

ESTUDIOS DE ANTICUERPOS: *Contacto previo*

- EIA anti-VHC: *Método de cribado*
- Dot-blot (NS3, NS4, NS5, E2 y core): *Confirmación*
- IgG específica de baja avidéz: *Infección aguda*

ESTUDIOS DE VIREMIA: *Infección activa*

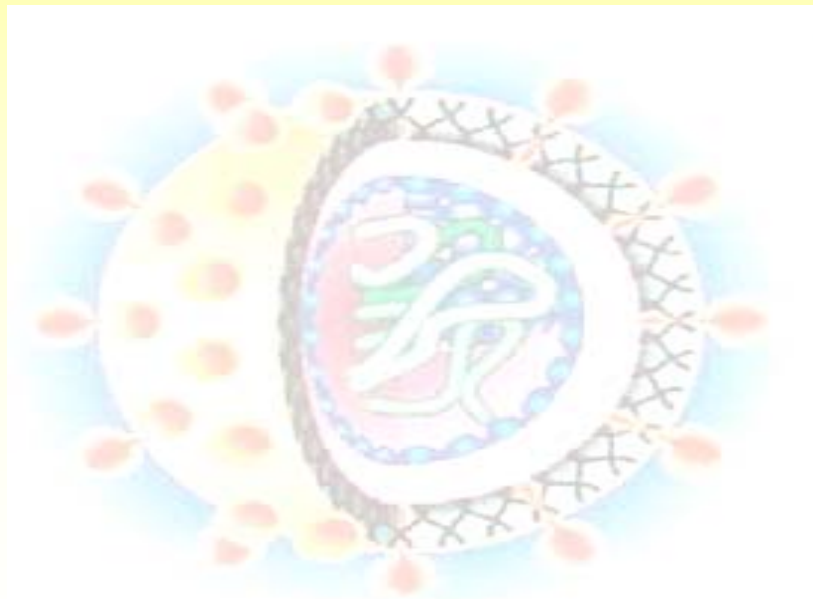
- ARN y Antígeno core (HCcAg)

TIPIFICACIÓN: *Tipo de VHC*

- Serotipificación y Genotipificación

Laboratorio

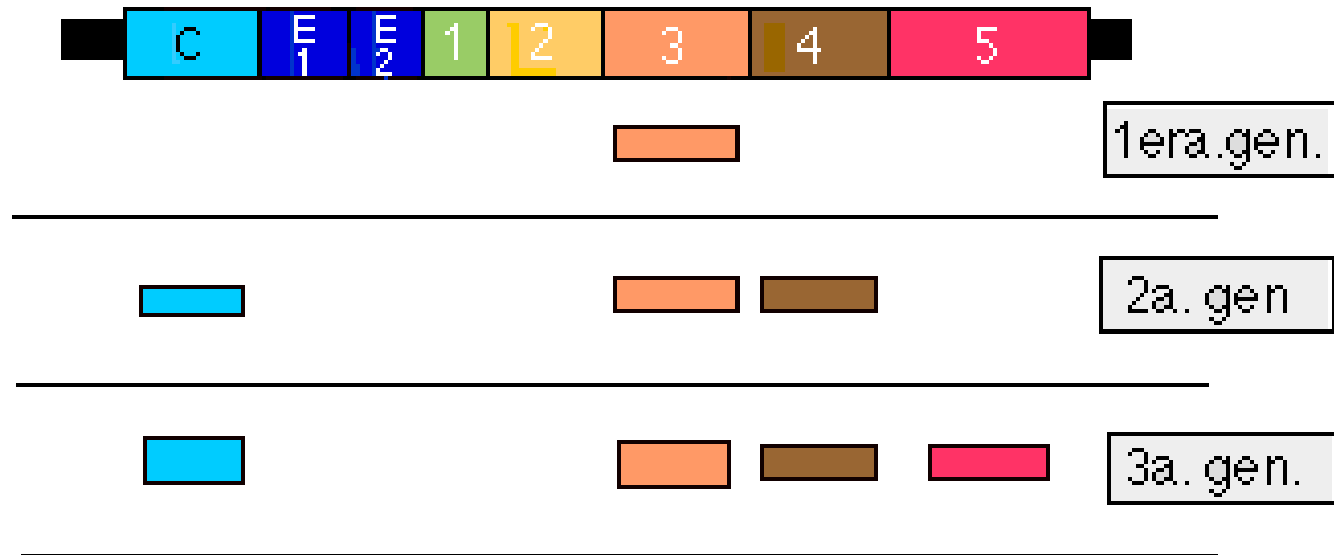
- Serología: subtipos
- DNA: genotipo (NS5b, E1, *core*) 5'UTR.



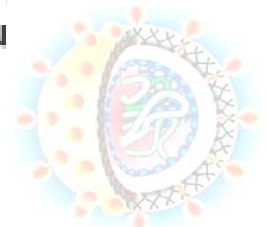
anti-VHC

estructural

no estructural



Diagnóstico de la infección por virus de la hepatitis C mediante la detección de anticuerpos utilizando el ensayo inmunoenzimático : anti-VHC ELISA. Las pruebas han evolucionado al incorporar cada vez mayor número de antígenos virales (2a y 3a generación) lo que incrementa la sensibilidad del método.

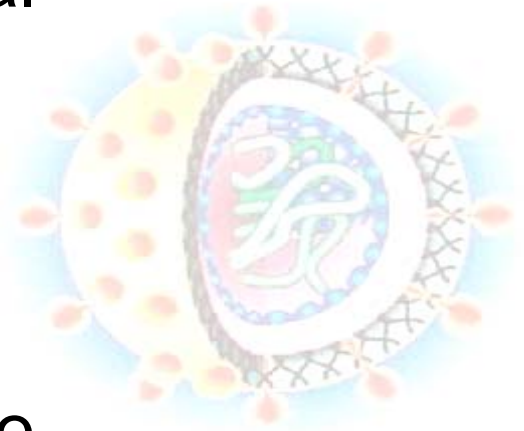


Antígeno Core de HCV por Elisa

- **Alternativa sensible y específica para investigar la viremia en pacientes con infección por HCV antes, durante y después del tratamiento**
- **Ensayo genotipo-independiente**
- **Ventajas sobre el HCV RNA:**
 - **No equipamiento especial**
 - **Bajo costo**
 - **Detección en 3-4 horas**
- **Atractivo para los bancos de sangre**

Utilidad Clínica del HCV RNA

- Marcador directo de replicación viral
- Diagnóstico de infección aguda
- Diagnóstico de infección oculta
- Transmisión vertical
- Transmisión por órganos sólidos
- Recurrencia de HCV post-trasplante
- **Confiabilidad de los productos sanguíneos**
- Accidentes de trabajo
- Monitoreo del tratamiento antiviral



Ventanas de seroconversión para HCV

Prueba	Dias
HCV Ab 1.0	98
HCV Ab 2.0	82
HCV Ab 3.0	70
RNA PCR	14

Características de Test serologicos para anti- HCV

ELISA

- 1ª Generación: NS4
- 2ª Generación: Core + NS3 + NS4
- 3ª Generación: Core + NS3 + NS4 + NS5
- 4ª Generación: Variantes virales NS3
+ 3ª Generación
- Combinación: Anti HCV + Ag HCV

(NAT)

- Basados en amplificación de secuencias de ácidos nucleicos; tienen alta sensibilidad y especificidad
- Detectan el ADN o el ARN de el agente etiológico, independientemente de la respuesta inmune (test de Acs
- Capaces de detectar un pequeño número de copias. Teóricamente, dependiendo de la cantidad de muestra y del número de repeticiones, pueden detectar <1 copia/ml

(NAT)

- Son positivos en período de viremia en la ausencia, o en la presencia de bajo título de Acs
- La sensibilidad mínima requerida por la FDA para testes para **VIH** e **VHC** es de **100 copias/ml**
- Para **HBV** y **WNV**, FDA está considerando requerimiento de detección de **10 copias/ml**
- La altísima sensibilidad, puede ser insuficiente para detectar donaciones con baja viremia que transmiten infección porque el volumen del inoculo (la transfusión) es muy alto (>250 ml)

Riesgo Residual ITT*

1993-1996

PV Serología

días

VIH	22	1: 3 000 000
VHC	70	1: 500 000
VHB	68	1: 135 000

2000-2002

PV NAT

días

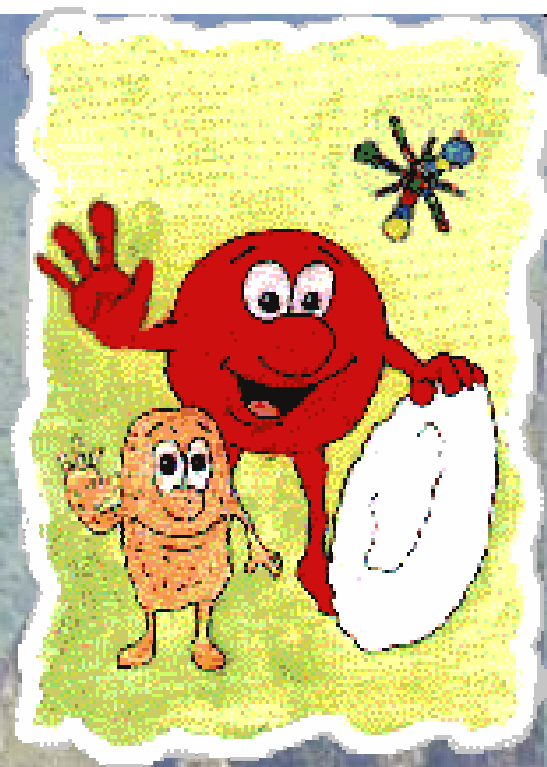
11	1: 5 000 000
10	1: 5 000 000
45	1: 250 000**

* *Schreiber et al NEJM;334:1685-90*

** serología PV: periodo de ventana

Objetivo

*reducir el período de
ventana serológica para
detectar infecciones vírales
agudas no detectadas por
métodos de tamizaje
convencional*



Muchas Gracias



Gracias