

## VIRUS HEPATITIS B: MÉTODOS MOLECULARES, PCR, BIOSENSORES Y PRUEBAS RÁPIDAS, EN SU DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO.

HEPATITIS B VIRUS: MOLECULAR BIOLOGY, PCR, BIOSENSORS AND RAPID TESTS, IN THEIR DETECTION AND DIAGNOSIS.

Marcos Restrepo-Arango,<sup>1</sup> Lina María Martínez-Sánchez,<sup>1</sup> Ingrid Johanna Escudero-Hernández<sup>1</sup>

### ABSTRACT

*Hepatitis B is now a disease with a high prevalence worldwide, thus calculating an average of 2 billion people with evidence of contagion. Therefore proper diagnosis and monitoring are continuing importance to the area of health. For 1965 it was described the first serological methods for the diagnosis and detection of this virus, remaining until now as the gold standard. However, there has been the need to introduce new methods that are not only able to diagnose serologically negative variants, but also more economical and reproducible in poor and inaccessible areas. For this molecular biology has played a vital role, has developed and studied various molecular methods, such as PCR, biosensors and rapid tests, leaving as a precedent that molecular biology should continue generating and studying this type of tests, so that a future avoidable the chronic complications of this disease thanks to an early, sensitive diagnosis and above all with a significant coverage.*

**KEY WORDS:** Hepatitis B, immunologic tests, serologic tests, molecular diagnostic techniques.

### RESUMEN

*La hepatitis B es una enfermedad con una prevalencia elevada a nivel mundial, con un promedio de 2 billones de personas con evidencia de contagio. Por este motivo su adecuado diagnóstico y seguimiento han sido de continua importancia para el área de la salud. Para el año 1965 fueron descritos los primeros métodos serológicos para el diagnóstico y detección de este virus, manteniéndose hasta ahora como el estándar de oro. Sin embargo, ha surgido la necesidad de presentar nuevos métodos que no sólo sean capaces de diagnosticar variantes serológicamente negativas sino también más económicos, sensibles, específicos y reproducibles en zonas de escasos recursos y de difícil acceso. Para esto la biología molecular ha tenido un papel vital, ha desarrollado y estudiado diversos métodos moleculares tales como la PCR, biosensores y pruebas rápidas, quedando como precedente que la biología molecular debe seguir generando y estudiando este tipo de pruebas, para que un futuro sean evitables las complicaciones crónicas de esta enfermedad gracias a un diagnóstico precoz, sensible y sobre todo con una cobertura significativa.*

**PALABRAS CLAVE:** Hepatitis B, pruebas inmunológicas, pruebas serológicas, técnicas de diagnóstico molecular.

### INTRODUCCIÓN

El Virus de la hepatitis B (VHB) es un virus hepatotrofo, perteneciente a la familia Hepadnaviridae, género Orthohepadnavirus cuyo material genómico es ADN circular de doble cadena parcial, de aproximadamente 3,2 Kb, el cual se replica a través de la

transcripción inversa de un ARN pregenómico (pgARN). Este genoma cuenta con siete proteínas virales, las cuales provienen de cuatro marcos de lectura abierta (ORFs), estas son: la polimerasa (ORF P), la proteína core o HBcAg y el antígeno e o HBeAg (ORF C), la proteína HBx (ORF X) y el antígeno de superficie (ABsAg) en sus tres formas (ORF S).<sup>1-3</sup>

El VHB, actualmente se clasifica en 10 genotipos, del A a la J, diferenciados principalmente por su secuencia genómica. La transmisión se puede presentar por diferentes vías: relaciones sexuales sin protección, transmisión vertical, uso compartido de jeringas y/o agujas contaminadas, percutánea o

Recibido: 11/2017

Aprobado: 04/2018

<sup>1</sup>Facultad de Medicina, Universidad Pontificia Bolivariana, Sede Central Medellín, Colombia.

Correspondencia: marcos.restrepo@upb.edu.com

parenteral. Este virus tiene una alta tasa de mutaciones en la secuencia que codifica el determinante "a" del HBsAg el cual se nombra como variante de escape; dato importante puesto que esta mutación, aunque es poco frecuente, puede llegar a diseminarse causando la infección por este virus en individuos vacunados.<sup>2,3</sup>

La inflamación hepática causada por el virus de la hepatitis B (VHB), es considerada una enfermedad grave y preocupante para la salud pública, ya que de 2 billones de personas que tienen evidencia serológica de infección por el VHB, 350 millones padecen de una infección crónica y un millón de estos muere cada año a causa de enfermedades hepáticas, las cuales incluyen cirrosis y cáncer hepático, ya que la infección por este virus es una de los principales agentes causales y factores de riesgo para desarrollar dichas patologías.<sup>1,3,4</sup>

Según la evidencia, las regiones con alta prevalencia de la infección por VHB se ubican en África sub-sahariana, el sudeste de Asia y en América (Brasil, Perú, Venezuela, Ecuador y Colombia por medio de la amazonia).<sup>2</sup> Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) las áreas de riesgo en América Latina fueron diferenciadas por su grado de endemia: baja en Centroamérica, Argentina y Paraguay (la seroprevalencia portadora es de 0,5 al 2%), intermedia en Colombia, Guatemala, Honduras y Cuba (cuando es entre 2 y 7%), y alta en la cuenca amazónica de Brasil, Perú, Venezuela, Haití y República Dominicana (cuando es mayor a 8%). Siguiendo con Latinoamérica, Chile es un país con baja endemicidad de infección por el VHB mostrando una seroprevalencia de 0,15%.<sup>5</sup> También se conoce que la situación de los países en vías de desarrollo agrava dicha enfermedad por las condiciones socio-sanitarias y la deficiencia en los programas de prevención.<sup>3</sup>

El primer programa de vacunación universal a nivel nacional para niños contra VHB se realizó en Taiwán en 1984, donde la cobertura actual supera el 97%. Por su parte, Colombia, inició en el departamento del Amazonas el primer programa universal de vacunación en la región, esto debido a su alta incidencia de infección por VHB.<sup>2</sup>

De manera general 92% de los países en el mundo han implementado esta vacuna; no obstante, se necesita de medidas más contundentes, debido a que la prevalencia global de la infección crónica por VHB ha disminuido poco, y en tres décadas de disponibilidad de vacunas aún no se encuentran los resultados esperados; específicamente desde 1990 a 2005 ha pasado de 4.2% a 3.7%.<sup>2,6</sup> A pesar de que en la actualidad se cuenta con siete medicamentos aprobados, para el tratamiento de la infección crónica por VHB, se conoce que la curación completa del VHB sólo

se logra en 3-5% de los pacientes que reciben terapia contra esta infección.<sup>6,7</sup>

En el contexto de accidentes de riesgo biológico la OMS estima que, para el año 2013 un aproximado de 66.000 infecciones se presentaron en personal de la salud en todo el mundo por pinchazo con objeto de bordes afilados. Este tipo de accidentes va más allá de la infección en sí, y se amplía a los efectos adversos generados por la profilaxis post-infección y los efectos psicológicos generados por la incertidumbre que genera el posible contagio.<sup>8</sup>

En el presente, destacamos la presencia de nuevos métodos que permiten diagnosticar variantes serológicamente negativas, económicos, sensibles y reproducibles en zonas de escasos recursos y difícil acceso.

### Diagnóstico y detección serológica del VHB

Para el diagnóstico de la infección y la enfermedad por el virus de la hepatitis B, se tienen en cuenta distintos parámetros, como: la clínica, la epidemiología del lugar y los estudios de laboratorio o moleculares.<sup>3</sup>

Las manifestaciones clínicas de esta patología dependen de su cronicidad, inicialmente se presenta un cuadro agudo consistente en astenia y adinamia, fiebre, mialgias y artralgias, náuseas y vómito, orina colúrica e ictericia con alteración del perfil bioquímico hepático. En la fase crónica los síntomas son leves, inespecíficos e intermitentes, acompañados de dispepsia e intolerancia alimenticia con elevaciones moderadas y pendulares de las transaminasas. Otra variante no menos importante es la forma fulminante, donde grandes alteraciones bioquímicas se presentan con una caída de los factores de coagulación causando una anulación de la función hepática y finalmente una falla multisistémica; por último la coinfección con otros virus, principalmente con el VHD, puede modificar los síntomas y el perfil bioquímico.<sup>9,10</sup>

Los estudios de laboratorio tienen como principio cuantificar, por suero o plasma, diferentes marcadores serológicos específicos, tales como: anticuerpos contra la proteína Core del VHB tipo inmunoglobulina M y G (anti-HBcAg de tipo IgM- IgG), el antígeno de superficie (HBsAg), el antígeno e (HBeAg, el antígeno c (HBcAg) y el anti-HBs, teniendo relación directa con los estadios de la enfermedad consecuencia de la actividad replicativa del hepatocito

y la respuesta inmunológica que esto trae.<sup>3,9</sup> También están presentes el ADN viral (carga viral) y los niveles de aminotransferasas (ALTs y AST)) que evalúan la aparición de la infección y la eficacia del tratamiento.<sup>11</sup> Por otra parte, la incorporación del diagnóstico molecular ha permitido la caracterización directa de los virus y su estructura genómica para identificar genotipos y subtipos del mismo virus infeccioso.<sup>12</sup>

Existe un parámetro establecido en la secuencia de aparición de los marcadores, que es: la carga viral, HBsAg, anti-HBc (IgM e IgG), HBeAg. Asimismo hay relación en la aparición de algunos marcadores, como los respectivos con la replicación viral que son el ADN-VHB y HBeAg y de forma indirecta anti-HBc IgM, anti-HBs y HBcAg.<sup>9</sup>

Todos los marcadores del VHB, exceptuando el antígeno del core (HBcAg) que no está fácilmente disponible comercialmente, son producidos y comercializados principalmente por: Abbott® (CLIA en Architect), Siemens (formato ELISA para BEP III y BEP 2000 Advance y formato CLIA para Advia Centaur XP), DiaSorin-Murex (ELISA, ETI- y CLIA, Liaison®), BioRad (formato ELISA, Monolisa™), Ortho (CLIA, Vitros ECI Immunodiagnostic System) BioMerieux (ELISA en formato monotest, VIDAS) y Roche (CLIA, Elecsys®).<sup>13</sup>

### Antígeno de Superficie HBsAg

El Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, es el marcador de tamizaje en la infección aguda, debido a que aparece 1 a 3 meses después de la exposición, por tal razón es el estudio inicial en la detección del virus por medio de técnicas de inmunoensayos como ELISA o por pruebas rápidas basadas en ensayos de inmunoadherencia por inmunocromatografía, aunque su resultado resulta luego de pocos minutos y su especificidad es buena, la sensibilidad es baja respecto a los inmunoensayos enzimáticos, fluorescentes o quimioluminiscentes.<sup>3,9,11,13</sup> La prueba ELISA detecta al menos 0,25 ng/mL de esta proteína, ya sea en su conformación salvaje de epítomos o en la de variantes surgidas.<sup>9</sup> Existe un periodo denominado "período de ventana" con una duración de 2 a 6 semanas, donde no se detecta HBsAg ni el Anti-HBs, debido a que aún se encuentran en escasa cantidad.<sup>14</sup> En caso de evolución favorable de la enfermedad, este antígeno desaparecerá a los 3 o 6 meses. Por ello, al mantenerse positivo por más de 6 meses, se hablará de un cuadro crónico.<sup>3,9</sup>

El HBsAg es una expresión de la ORF S del gen S, sintetizado en el hepatocito por la traducción de varios

ARNm. Se libera al torrente sanguíneo en gran cantidad, entre 50 µg/ml y 1 µg/ml, en forma de agregados esféricos o filamentosos, esto dependiendo de la cantidad de proteína preS1 o preS2 que contengan. También existe otra parte de proteína de superficie, aún más pequeña, con proporciones reguladas de fracciones preS1 y preS2, la cual tiene una característica muy importante, ella forma parte de la estructura del virión, conocida como partícula de Dane.<sup>9,13</sup>

Se describen diferentes fenotipos del HBsAg, que cuentan con un determinante antigénico específico de grupo, llamado "a", y dos grupos de subdeterminantes alélicos tipo-específicos determinados como "d" o "y", "w" o "r". En resumen, se conocen cuatro subtipos principales de proteína HBsAg: adw, adr, ayw, ayr permitiendo demostrar la complejidad antigénica del VHB.<sup>13</sup>

También existe un falso negativo del HBsAg descrito por EASL (European Association for the Study of the Liver), que la define como la infección oculta por el VHB; entre sus características cuenta con la presencia de ADN del VHB en el hígado (con o sin ADN viral en suero) de personas con resultados negativos para el HBsAg. Esta excepción no ha sido bien descrita y tiene varios campos que aún están en estudio.<sup>9</sup>

### Anti-HBc

Existen dos tipos de anticuerpos dependientes de la respuesta de la inmunoglobulina, IgM o IgG. En general, son marcadores de infección aguda junto con el HBsAg; sin embargo, existen casos donde el anti-HBc es el único marcador visible. La detección de estos se realiza por inmuno ensayos, principalmente por ELISA.<sup>9,11,15</sup>

### Anti-HBcAg tipo IgM

Los anti-HBc producidos inicialmente son predominantemente de clase IgM y va declinando hasta desaparecer alrededor del sexto mes; es decir, al término del periodo de incubación del virus, por esto se puede concluir que el anti-HBc IgM es un marcador de actividad inflamatoria causado por la infección.<sup>9,11,13,14</sup>

Solo en el caso del establecimiento de la infección crónica o reactivación es posible nuevamente su detección de forma intermitente y en concentraciones más bajas.<sup>9</sup>

### Anti-HBcAg tipo IgG

El anti-HBc IgG es ya detectable con los síntomas iniciales de la infección y persiste en el suero

durante toda la enfermedad y más allá de la curación clínica. Al contrario de lo que sucede con la IgM, la concentración de los anticuerpos de clase IgG continúa en ascenso hasta la recuperación y permanecen detectables de por vida presentando gran utilidad en estudios epidemiológicos sobre inmunidad adquirida.<sup>9,13</sup>

Su positividad indica contacto con el virus y aunque se encuentra a títulos muy elevados en las fases agudas y convalecientes, no es un anticuerpo protector. En síntesis se puede decir que el anti-HBc IgG siempre es detectable después de una infección; no obstante, su presencia no siempre indica infección activa.<sup>9,13</sup>

### **Antígeno HBeAg**

Es el antígeno que evalúa si el paciente tiene una infección por una cepa salvaje (+) o una mutante (-), ya que su detección se relaciona con la existencia de una alta actividad replicativa del virus y elevada viremia (entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>8</sup> equivalentes genómicos por mililitro de suero), causando un cuadro altamente contagioso; este estado se confirmaría con la elevación de su anticuerpo específico, el anti-HBe.<sup>9,13,15</sup> Por lo anterior, la determinación de su presencia es obligatoria en todas las muestras HBsAg positivas, aún cuando, este marcador es detectable en algunos pacientes HBsAg positivos, en la fase aguda o crónica de la enfermedad.<sup>9</sup> En mujeres gestantes positivas para HBsAg, es importante la determinación de este antígeno ya que se documenta una relación existente entre su presencia y la transmisión vertical de la enfermedad.<sup>13</sup>

Se reporta que al observarse altas concentraciones de HBeAg en las primeras semanas o su persistencia más allá de las 6-8 sem de la infección podría indicar un curso crónico de la enfermedad; por ejemplo, en una hepatitis crónica replicadora aparece el virus mutante y este prolifera, con pronóstico de lesión hepática.<sup>9</sup> En contraste, en los casos de buena evolución su reactividad disminuye con el tiempo, haciéndose indetectable siempre antes de la desaparición del HBsAg. La seroconversión temprana para este marcador indica, casi siempre, recuperación de la enfermedad.<sup>13</sup>

El HBeAg es una proteína no estructural del VHB. Se origina por la traducción del mismo ARNm codificador del HBcAg previamente procesado y, por tanto, posee secuencias de aminoácidos que son idénticas a las que forman la nucleocápside viral. El HBeAg es más pequeño que la proteína HBcAg y existe de forma monomérica, esta característica permite que sean antigénicamente diferentes.<sup>13</sup>

### **Anti-HBs**

Es el último marcador en aparecer, es un anticuerpo que confiere inmunidad frente al virus, es provocado por la aparición del HBsAg, donde estos actúan.<sup>9,10,13</sup>

La detección de este marcador podría tener distintas funciones, tales como: inmunidad de larga duración frente a la reinfección gracias a la infección previa. En los vacunados es el único marcador de VHB presente y se considera que un individuo está protegido si la concentración de este anticuerpo supera las 10-20 mUI/mL y la monitorización del tratamiento, todo esto es logrado por las pruebas serológicas comerciales.<sup>9,10,13</sup>

En todos los enfermos y personas vacunadas, el anticuerpo predominante es el Anticuerpo dirigido frente al determinante común "a" del HBsAg (anti-HBs).. En estos dos casos expuestos existe una diferencia: en las personas vacunadas, la respuesta no es tan intensa como la que ocurre tras la infección y, los anticuerpos inducidos mediante la vacuna disminuyen a mayor velocidad hasta su posible total desaparición.<sup>10</sup>

### **HBcAg**

Antígeno de la cápside, antígeno de la nucleocápside o antígeno del "core". El "core" del VHB lo conforman: ácido nucleico, ADN polimerasa y una nucleoproteína antigénica. Se sintetiza en el núcleo de los hepatocitos infectados formando una nucleocápside. Seguidamente se recubre con el HBsAg en el citoplasma.<sup>13</sup>

Este antígeno, es muy difícil de identificar, se halla en el suero del enfermo junto con la partícula de Dane. Las técnicas utilizadas requieren del tratamiento previo de la sangre para eliminar el HbsAg que lo oculta.<sup>13</sup>

### **Carga viral VHB**

Es un marcador serológico plasmático que permite definir la presencia de la infección al diferenciar la condición de portador inactivo o asintomático mediante la determinación de la infectividad; también permite dar un seguimiento del tratamiento y su eficacia ya que sus valores se relacionan con la necrosis hepática. La carga viral es, además, el mejor predictor de la progresión a cirrosis y carcinoma hepatocelular, siendo proporcional a los niveles de carga viral.<sup>9,15</sup>

Puede ser medido por inmunoensayos de amplificación, tales como: PCR, bADN e Hibridación, los cuales tienen una alta sensibilidad contra la infección.<sup>13,15</sup>

### Diagnóstico molecular del VHB

En el año 1965 fue descrito el antígeno del VHB (HBsAg) como el primer marcador conocido para identificar la infección activa por este virus es una de las principales; y desde entonces es el método principal para diagnosticar esta enfermedad. Sin embargo, la aparición de pruebas moleculares diversas que ayudan con el mayor conocimiento del estado de la infección, su diagnóstico y el comportamiento de la misma, se han vuelto de importancia en casos de enfermedad crónica con bajas cargas virales o antígeno oculto.<sup>16</sup>

Como es sabido el método diagnóstico más utilizado hasta ahora es la serología; sin embargo, en los últimos años se han estudiado métodos moleculares diferentes alrededor del estudio de esta enfermedad debido al incremento de las infecciones serológicamente negativas.<sup>17</sup> Entre estos métodos moleculares están los ensayos de detección basados en ácidos nucleicos para el ADN del VHB, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa, estrategias de amplificación isothermal, replicación en círculo rodante, amplificación mediada por transcripción, amplificación de desplazamiento del filamento (SDA), secuenciación, biosensores entre otros. En esta sección se discutirán algunos de estos procesos y cómo han impactado las acciones dirigidas hacia esta enfermedad.<sup>17</sup>

### PCR

En un estudio realizado por Kania et al. demostraron que al comparar dos técnicas de PCR en tiempo real (qPCR) con el método comercial COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan®, que está basado en la amplificación de ácidos nucleicos, ambas dieron como resultado un rendimiento elevado para cuantificar el ADN del VHB en suero. Sin embargo, se encontraron resultados similares entre las dos pruebas para detectar niveles por encima de 107 Log<sub>10</sub> UI/ml de ADN. Los autores concluyeron que las dos qPCR presentadas son aptas para el manejo y detección rutinaria de ADN viral no solo por ser efectivo a partir de 2'000UI/ml sino también por su bajo costo y fácil reproducción; sin embargo, aclaran que podría resultar insuficiente ante la presencia de infección con VHB oculto.<sup>18</sup>

Wang et al., al igual que en el estudio anterior, diseñaron dos qPCR basadas en cebadores

conservadores y sondas TaqMan para la identificación y cuantificación de genotipos tipo B y no tipo B, con el objetivo de establecer en método rápido, económico y sencillo para la cuantificación y genotipificación del VHB. La sensibilidad encontrada para este doble método fue de 500 UI/ml y con una concordancia del 95.9% con dos kits comerciales producidos por Qiagen y Roche. Las ventajas que reportan los autores son la gran variedad de genotipos encontrados y la capacidad de identificar genotipos mixtos, lo que llevó a la creación de un método de cuantificación y genotipificación simultánea con una alta sensibilidad y especificidad, además de económico y reproducible.<sup>19</sup>

En un estudio que comparó el ensayo Abbott qPCR y la Da-na qPCR para la cuantificación en suero de ADN de VHB; Qiu et al. demostraron que el ensayo tipo Abbott era mucho más sensible que el Da-na qPCR, con una sensibilidad de 15.0 UI/0.2ml contra 1'000 UI/0.2ml respectivamente; y se evidenció también una superioridad en la identificación de niveles que la prueba Da-na qPCR no lo hizo. Esto llevó a los autores a concluir que la prueba Da-na qPCR necesita mayores estudios y mejoras en su desarrollo.<sup>20</sup> Portilho et al. compararon tres métodos de PCR con los métodos cuantitativos comerciales. Los autores encontraron que la PCR semi-anidada fue el mejor de los tres métodos comparados con los comerciales y que representaría una buena opción para el diagnóstico y seguimiento del VHB en lugares de escasos recursos.<sup>21</sup>

### Biosensores

Existen diversos tipos de biosensores utilizados para el diagnóstico del VHB; entre ellos se encuentran los basados en nanotecnología, electroquímicos, piezoeléctricos y los biosensores SPR.<sup>22</sup> Chen et al. estudiaron el papel de un biosensor de impedancia nanoestructurado en la detección del VHB basado en una técnica gratuita de PCR. El límite inferior encontrado para esta prueba fue de 111 copias/ml, y comparado con el COBAS® AmpliPrep (un método basado en qPCR) se encontraron resultados muy similares; sin embargo, permite una detección más eficaz ante muestras de baja concentración viral.<sup>23</sup>

Mao et al. proponen un método colorimétrico más económico que los equipos clásicos de detección de ADN basado en nanoclusters de cobre para asegurar la rentabilidad. Como resultado los autores encontraron varios beneficios de su método sobre los convencionales. Inicialmente el resultado de su método puede ser visualizado a simple vista sin necesidad de microscopio; además es un método de bajo costo con

propiedades físico químicas que lo hacen de fácil aplicación y por último tiene un límite de detección de  $12 \times 10^9$  moléculas. Además el método permite ser adaptado para generar variantes para diagnosticar variedad de enfermedades genéticas.<sup>24</sup>

En un estudio realizado por Cabral et al. proponen la utilización de un inmunosensor electroquímico para el antígeno Core de la hepatitis B, debido a que es el marcador que mas temprano se presenta en la infección y que se mantiene durante toda la vida. Lo que hicieron fue una superficie nanohíbrida recubierta por ácido hialurónico para detectar el antígeno y encontraron que la utilización de estos materiales permitía una mayor inmovilización de antígenos aumentando considerablemente la sensibilidad diagnóstica de la prueba, con una detección límite de  $0.03 \text{ ng ml}^{-1}$ .<sup>25</sup>

### Otros métodos

Yang et al. compararon la prueba Lumipulse G HBsAg-Quant con las pruebas clásicas Architect y Elecsys y encontraron que el método Lumipulse HBsAg-Quant es una buena opción para la detección de VHB en muestras clínicas o en sangre donante incluso con trazas del antígeno; sin embargo, estos autores advierten sobre la precaución en la interpretación de los resultados que exige una prueba ultrasensible como esta, ya que permite estudiar el significado de niveles muy bajos de antígeno, teniendo cuidado de no causar alarmas innecesarias a los pacientes.<sup>26</sup> Por otra parte, Khedr et al. Hicieron la propuesta de un novedoso método que consiste en el posible papel del perfil fosfolípido de los pacientes con infección por VHB, dengue y hepatitis C como biomarcador sérico. Los resultados facilitaron el establecimiento de las diferencias entre el perfil de los pacientes sanos y los pacientes contagiados con dichas enfermedades, lo que potencia este método como una posible herramienta para el diagnóstico.<sup>27</sup>

Las pruebas rápidas son otro ejemplo de métodos diagnósticos para la hepatitis B aguda; Cruz et al. evaluaron tres pruebas rápidas (Vikia® HBsAg, HBsAg Teste Rápido®, y Imuno-Rápido HBsAg®) basadas en HBsAg como herramienta útil para el diagnóstico en zonas remotas o de bajos recursos utilizando como prueba estándar ELISA. Como resultado del estudio se encontró que la sensibilidad de las pruebas rápidas para el diagnóstico de VHB está por encima de 93.0%, con una concordancia con la prueba ELISA desde 70% hasta 100%, lo que confirma su posible aplicabilidad para el diagnóstico agudo de hepatitis B

en zonas con escasos recursos.<sup>28</sup> Bottero et al. evaluaron las pruebas rápidas VIKIA-HBsAg/Quick Profile anti-HBsAb y encontraron que la utilización de pruebas rápidas acompañado de confirmación por ELISA no aumentan las tasas de vacunación contra el VHB, lo que sería lo esperado al aumentar la sensibilidad de la prueba; sin embargo, aclaran que la falta de pruebas con la suficiente confiabilidad para la identificación de anticuerpos del VHB en comparación con ELISA, podría ocasionar desventaja de las pruebas rápidas.<sup>29</sup> Por lo tanto, aún no es posible confiarse de manera segura en las pruebas rápidas por encima de la ELISA para llegar al diagnóstico en lugares de difícil acceso a recursos diagnósticos como estos.

La hepatitis B sigue siendo una enfermedad de alta prevalencia que representa para la salud pública un problema que genera altos costos en prevención, diagnóstico y tratamiento; y es en la biología molecular donde se encuentran las herramientas más tangibles para aportar medidas efectivas para la intervención de esta enfermedad.

Las pruebas actualmente existentes para diagnóstico de esta patología como método estándar siguen siendo costosas y de difícil acceso oportuno a todas las comunidades del país, por lo cual se hace necesario la generación de nuevas pruebas que sean no solo sensibles sino que su costo sea proporcional a la capacidad adquisitiva poblacional o que estas mismas formen parte del plan de aseguramiento en salud de las comunidades y de esta manera lograr intervenciones tempranas sobre una enfermedad que genera secuelas costosas para el sector salud y afecta la morbimortalidad en todos los grupos poblacionales.

Es claro entonces que el desarrollo en biología molecular está teniendo y tendrá un papel importante en el estudio, diagnóstico y tratamiento de múltiples enfermedades, ya que es en este ámbito, en el origen y explicación celular de las enfermedades en donde se podrá intervenir de manera directa la fisiopatología de las mismas.

### CONCLUSIONES

El virus de la hepatitis B es un agente infeccioso de alta prevalencia lo cual hace necesaria la creación y el estudio de métodos no sólo más precisos sino también más innovadores, rápidos, económicos y reproducibles. La serología sigue siendo y siempre será una opción de diagnóstico y seguimiento valiosa para el clínico, pero al ser una técnica costosa, compleja y no disponible en todas las áreas del país, las técnicas moleculares serán

cada vez más acogidas en el ambiente científico-médico. La PCR en tiempo real (qPCR) y la PCR semi-anidada, independiente del método comercial, son aptas para el manejo y detección rutinaria de ADN viral, además de presentar un bajo costo y fácil reproducción, constituyen una buena opción en lugares con recursos limitados. Por otro lado, la prueba Da-na qPCR necesita mayores estudios y mejoras en su desarrollo.

Existen diferentes tipos de biosensores disponibles para la detección eficaz, como el de impedancia nanoestructurado, aunque presenta resultados similares a qPCR, tiene la ventaja de realizar una detección más eficaz ante concentraciones virales bajas; de la misma manera, el método colorimétrico por medio de nanoclusters de cobre, tiene la facilidad de visualización sin microscopio; además de tener bajo costo y un límite de detección bajo causando alta capacidad diagnóstica para diferentes variedad de enfermedades genéticas. Por último, el inmunosensor

electroquímico para el antígeno Core de la hepatitis B, permite aumentar la sensibilidad diagnóstica por un aumento de la inmovilización de antígenos y una detección alta con concentraciones virales bajas.

Las pruebas rápidas, cuentan con una sensibilidad por encima de 93.0 % para el diagnóstico de VHB que podría ser útil en casos agudos y zonas con escasos recursos.

Finalmente, se concluye que desde la biología molecular se debe seguir generando, estudiando e incentivando el desarrollo de pruebas diagnósticas que incluyan tanto rapidez, sensibilidad, especificidad y costo-efectividad, con el fin de minimizar las complicaciones y diseminación de la enfermedad, asegurando una cobertura adecuada y el acceso oportuno a la vacunación y el tratamiento si está indicado.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, et al. The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity* 2015; 42(1):123-132.
- 2) Jaramillo CM, Navas MC. [Escape mutants of hepatitis B virus]. *Rev Chilena Infectol* 2015; 32(2):190-197.
- 3) Olmedo GB, Zorrilla M, Bobadilla ML, Villagra V, Avalos DS, Huber C, et al. Serorreactividad al antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B en mujeres que acudieron al Laboratorio Central de Salud Pública. Asunción, Paraguay. *Mem Inst Investig Cienc Salud* 2015;13(3):96-102.
- 4) Brown RS Jr, McMahon BJ, Lok AS, Wong JB, Ahmed AT, Mouchli MA, et al. Antiviral therapy in chronic hepatitis B viral infection during pregnancy: a systematic review and meta-analysis *Hepatology*. 2016; 63(1):319-333.
- 5) Villena R, Zubieta M, Hurtado C, Salgado C, Silva G, Fernández J, et al. Seroconversión frente a primovacunación reforzada contra hepatitis B en niños con cáncer. *Rev Chil Pediatr* 2015;86(4):236-243.
- 6) Lok AS, McMahon BJ, Brown RS Jr, Wong JB, Ahmed AT, Farah W, et al. Antiviral therapy for chronic hepatitis B viral infection in adults: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology* 2016; 63(1):284-306.
- 7) Martin P, Dubois C, Jacquier E, Dion S, Mancini-Bourgine M, Godon O, et al. TG1050, an immunotherapeutic to treat chronic hepatitis B, induces robust T cells and exerts an antiviral effect in HBV-persistent mice. *Gut* 2015; 64(12):1961-1971.
- 8) Gorman T, Dropkin J, Kamen J, Nimbalkar S, Zuckerman N, Lowe T, et al. Controlling Health Hazards to Hospital Workers. *New Solut* 2013; 23 Suppl: 1-167.
- 9) Alonso R, Aguilera A, Córdoba J, Fuertes A. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis virales. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016;33(9):53-62.
- 10) Asociación Catalana de Enfermos de Hepatitis. ASSCAT; 2007. Disponible en: <http://asscat-hepatitis.org>. Consultado 16 septiembre 2015.
- 11) Ríos-Ocampo A, Restrepo J, Cortés F, Correa G, Navas M. Infección oculta por el virus de la hepatitis B Aspectos clínicos epidemiológicos y moleculares. *Acta Med Colomb* 2013; 38(3): 143-153.
- 12) Panduro A, Meléndez GE, Fierro NA, Madrigal BR, Zepeda-Carrillo EA, Román S. Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud Publica de Mex* 2011; 53(Suppl 1): S37-S45.
- 13) Aguilera A, Alonso R, Córdoba J, Fuertes A. Diagnóstico microbiológico de las hepatitis víricas. Madrid: Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 2014. 11-25
- 14) Vega C. Estudio de la incidencia de hepatitis B en estudiantes. Machala, Ecuador: Universidad Técnica de Machala 2014. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1362/8/CD00259-TESES.pdf>. Consultado 16 de septiembre de 2015.

- 15) Tob J. Hepatitis viral B y su manejo. *Rev Med FCM-UCSG* 2010;16(4):307-332.
- 16) Villar LM, Cruz HM, Barbosa JR, Bezerra CS, Portilho MM, Scalioni L de P. Update on hepatitis B and C virus diagnosis. *World J Virol* 2015;4(4):323-342.
- 17) Datta S, Chatterjee S, Veer V. Recent advances in molecular diagnostics of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 2014 Oct 28;20(40):14615-14625.
- 18) Kania D, Ottomani L, Meda N, Peries M, Dujols P, Bolloré K, et al. Performance of two real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA detection and quantitation. *J Virol Methods* 2014; 201:24-30.
- 19) Wang W, Liang H, Zeng Y, Lin J, Liu C, Jiang L, et al. Establishment of a novel two-probe real-time PCR for simultaneously quantification of hepatitis B virus DNA and distinguishing genotype B from non-B genotypes. *Clin Chim Acta* 2014; 437:168-174.
- 20) Qiu N, Li R, Yu JG, Yang W, Zhang W, An Y, et al. Comparison of Abbott and Da-an real-time PCR for quantitating serum HBV DNA. *World J Gastroenterol* 2014;20(33):11762-11769.
- 21) Portilho MM, Baptista ML, da Silva M, de Sousa PS, Lewis-Ximenez LL, Lampe E, et al. Usefulness of in-house PCR methods for hepatitis B virus DNA detection. *J Virol Methods* 2015;223:40-44.
- 22) Yao CY, Fu WL. Biosensors for hepatitis B virus detection. *World J Gastroenterol* 2014;20(35):12485-12492.
- 23) Chen C, Lai Z, Wang G, Wu C. Biosensors and Bioelectronics Polymerase chain reaction-free detection of hepatitis B virus DNA using a nanostructured impedance biosensor. *Biosens Bioelectron* 2016;77:603-608.
- 24) Mao X, Liu S, Yang C, Liu F, Wang K, Chen G. Colorimetric detection of hepatitis B virus (HBV) DNA based on DNA-templated copper nanoclusters. *Anal Chim Acta* 2016;909:101-108.
- 25) Cabral DG, Lima EC, Moura P, Dutra RF. A label-free electrochemical immunosensor for hepatitis B based on hyaluronic acid - carbon nanotube hybrid film. *Talanta* 2016;148:209-215.
- 26) Yang R, Song G, Guan W, Wang Q, Liu Y, Wei L. The Lumipulse G HBsAg-Quant assay for screening and quantification of the hepatitis B surface antigen. *J Virol Methods* 2016;228:39-47.
- 27) Khedr A, Hegazy MA, Kammoun AK, Shehata MA. Phospholipidomic identification of potential serum biomarkers in dengue fever, hepatitis B and hepatitis C using liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 2015;1010:44-54.
- 28) Cruz HM, Scalioni L de P, de Paula VS, da Silva EF, do Ó KM, Milagres FA, et al. Evaluating HBsAg rapid test performance for different biological samples from low and high infection rate settings & populations. *BMC Infect Dis. BMC Infectious Diseases* 2015;15(1):548.
- 29) Bottero J, Boyd A, Gozlan J, Carrat F, Lemoine M, Rougier H, et al. Effectiveness of hepatitis B rapid tests toward linkage-to-care. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2016;28(6):633-639.