

## PERFILES ATÍPICOS EN LA SEROLOGÍA PARA HEPATITIS B

Caio M. M. de Cordova, PhD - Farmacéutico-bioquímico  
Profesor de Bioquímica Clínica del Curso de Farmacia y Bioquímica de la  
Universidad Regional de Blumenau - Brasil

Esto puede causar cierta confusión tanto para el profesional del laboratorio como para el médico, que pueden tener dificultades en la interpretación de estos perfiles y cuestionar la validez del resultado. Esto se suma a que muchos profesionales aún tienen dificultades en solicitar o sugerir los marcadores más indicados para el diagnóstico de hepatitis B. Es conveniente por esto, revisar algunos aspectos de la infección por el virus de la hepatitis B. El HBV es un virus a DNA hepatotrópico, transmitido principalmente por la sangre y derivados, líquidos seminal, vaginal y saliva. Luego de la infección, el período de incubación puede variar de 45 a 180 días. La sintomatología es más pronunciada con la edad del paciente, teniendo más frecuencia la hepatitis aguda en adultos, con aproximadamente 0,5 a 1% de casos fulminantes. En niños menores de 5 años, sólo un 10% presentarán sintomatología. Este es uno de los aspectos más importantes de la infección, dado que entre el 30 y el 90% de los niños infectados por HBV pueden desarrollar hepatitis crónica. Esto

puede evolucionar de forma asintomática o subclínica, poniéndose de manifiesto años más tarde con el desarrollo de cirrosis y adenocarcinoma hepático. El adenocarcinoma se manifiesta en alrededor del 50% de los individuos con hepatitis crónica. Por otra parte, de los individuos adultos infectados por HBV, sólo un 2 a 10% evolucionan hacia la hepatitis crónica.

### Perfiles serológicos típicos de la hepatitis B

Normalmente, en una situación de infección aguda, dentro de los 30 a 45 días posteriores a la exposición al virus, comienza a detectarse en circulación el antígeno de superficie HBsAg. Esta aparición ocurre previamente a la elevación de las transaminasas y permanece detectable alrededor de 4 meses. Otro método que puede utilizarse en los comienzos de la infección es la detección del antígeno "core" HBcAg con anticuerpos monoclonales que reduce el período de ventana a alrededor de 14 días, así como los métodos de detección de DNA viral que lo re-

Los métodos serológicos para el diagnóstico de hepatitis B causada por el virus HBV se encuentran bien difundidos en la rutina del laboratorio, estando los profesionales, habituados a sus características y desempeño. No obstante, a pesar de la confiabilidad de los métodos, con óptimos valores predictivos positivo y negativo, algunas muestras presentan perfiles de reactividad fuera de los patrones típicos hallados en la literatura.

ducen a 7 días. Luego aparecen los anticuerpos anti-HBc. El primer anticuerpo detectable es anti-HBc de tipo IgM que permanece aproximadamente 4 meses. Luego aparecen los anticuerpos anti-HBc de tipo IgG que tienden a permanecer a lo largo de toda la vida del individuo. En esta fase inicial aparece el HbeAg (antígeno de "envelope"), inmediatamente el HBsAg, seguido de la sintomatología. El HBeAg es un marcador de replicación viral. Con la evolución de la infección, los niveles de HBeAg comienzan a disminuir con el surgimiento de los anticuerpos anti-HBe, indicadores de buen pronóstico. Los anticuerpos anti-HBs son los indicadores de inmunidad y aparecen a la semana o hasta dos meses y medio después de la aparición del HBsAg, permaneciendo detectables por años o décadas. En una situación de evolución hacia la cronicidad, el HBsAg y en seguida el HBeAg aparecen y permanecen detectables por años. Luego surgen los anticuerpos anti-HBc, inicialmente IgM e inmediatamente los de clase IgG. Los niveles de HBeAg y de HBsAg dismi-

nuirán sólo en caso de resolución de la infección, normalmente luego del tratamiento antiviral, con la aparición de los anticuerpos anti-HBe. Sin embargo, no son raros los casos de resolución de la infección crónica en que no se detectan anticuerpos anti-HBs.

Por esto, inicialmente no es necesaria la investigación de todos estos marcadores para el diagnóstico de la infección. Un perfil económicamente criterioso, además de los marcadores de hepatitis A y C (anti-HAV total y anti-HCV total), puede incluir simplemente HBsAg y anti-HBc total. En caso de ser negativos ambos marcadores, prácticamente se descarta la infección por HBV. En caso de ser positivos ambos marcadores, un resultado positivo de anti-HBc IgM indicará infección aguda y un resultado negativo, infección crónica. A partir de aquí, un perfil con HBeAg negativo y anti-HBe positivo es indicador de buen pronóstico cuya evolución puede ser monitoreada por la aparición de anticuerpos anti-HBs. Por otro lado, un perfil con HBeAg positivo e anti-HBe negativo indica replicación viral que puede ser monitoreada con la determinación de carga viral por métodos de biología molecular. Sin embargo, se puede observar inicialmente un perfil con HBsAg positivo y anti-HBc negativo normalmente debido a un período de ventana. La repetición del ensayo dentro de dos semanas, debe mostrar aparición de anticuerpos anti-HBc. Por otro lado, un resultado con HBsAg negativo y anti-HBc positivo es indicativo de un período de ventana o una infección pasada. En este caso, normalmente un resultado con anti-HBs positivo indica inmunidad debida a una infección pasada y anti-HBs negativo es indicativo de un período de ventana que puede ser monitoreado también con la presencia de otros marcadores de infección, como HBeAg y anti-HBe.

### Perfiles atípicos: ¿qué hacer?

No todos los individuos evolucionan de la manera citada. Excluyendo las situaciones de reacciones cruzadas y resul-

tados falso-negativos inherentes a los métodos de inmunodiagnóstico, suelen aparecer en la rutina del laboratorio, algunos resultados atípicos que no se correlacionan con los anteriormente descritos. Dentro de éstos se destacan principalmente:

- i) las situaciones causadas por virus con mutaciones en la secuencia que codifica el HBsAg,
- ii) las diferentes situaciones donde sólo se encuentra el anticuerpo anti-HBc aisladamente, y
- iii) las situaciones causadas por virus que presentan mutaciones en el HBeAg.

Una de las mutaciones más importantes que puede aparecer en el genoma del HBV es la que ocurre en la llamada “mutante a”, que presenta una sustitución en el aminoácido 145 del HBsAg. Esta mutación provoca una alteración en la estructura del antígeno de forma que no es detectado con los métodos actuales que utilizan anticuerpos monoclonales. Esta puede ser una de las principales causas de los perfiles serológicos atípicos de pacientes que, estando infectados por el HBV, presentan positividad para HBeAg con la aparición subsecuente de anticuerpos anti-HBe y anti-HBc, pero tienen niveles no detectables de HBsAg así como de anti-HBs. Los anticuerpos responsables de la respuesta inmune contra la “mutante a” tampoco son detectados por los métodos serológicos que utilizan el HBsAg salvaje para capturar los anticuerpos eventualmente presentes en el suero. Para confirmar el diagnóstico, el médico puede solicitar una prueba de detección del DNA del virus. Cabe destacar que la vacuna contra la hepatitis B no protege contra esta variante. Se estima que esta variedad puede llegar a superar a la cepa salvaje en aproximadamente 4 a 5 generaciones (90-100 años) en caso de no ser introducida en la vacuna. En la actualidad se están realizando investigaciones sobre el tema, incluso para el desarrollo de kits capaces de detectar el HBsAg mutado. Cerca de 10 a 40% de los individuos con anti-HBc aislado presentan la “mutante a” en títulos bajos. Como se pue-

de notar, el resto de los casos no pueden ser explicados solamente por la presencia de la variante. Los pacientes con HBsAg no detectable y que también tienen DNA viral positivo, pueden presentar:

- a) solamente anti-HBc positivo,
- b) anti-HBc y anti-HBs positivos,
- c) solamente anti-HBs positivo, o
- d) ningún marcador de infección viral.

Estos individuos normalmente tienen niveles muy bajos de DNA viral. Además de la presencia de la “mutante a”, una de las explicaciones para la no detección del HBsAg es una baja replicación viral del virus salvaje, con la presencia o no de anti-HBs. Existen relatos de cepas de HBV con mutaciones en el gen de la polimerasa, lo que resulta en una baja replicación del virus. Además de esto, cepas con mutaciones en la región promotora del HBsAg presentan una producción muy baja del antígeno. Otra hipótesis sostenida por algunos autores es la existencia de un equilibrio del virus con el sistema inmune, que dificulta la persistencia de marcadores serológicos a niveles detectables. Otras situaciones donde solamente se encuentra el anti-HBc aislado, son los períodos de ventana y los casos de infección resuelta hace décadas, donde los niveles de anti-HBs ya disminuyeron significativamente. Clínicamente, los pacientes que presentan anti-HBc aislado son generalmente asintomáticos y tienen niveles normales de transaminasas con buen pronóstico. No obstante, deben ser considerados potencialmente infecciosos y muchos son incluso infectados con HIV o HCV. La propia situación de co-infección puede resultar en la disminución de la replicación del HBV dando niveles no detectables de HBsAg. En caso de que estos pacientes presenten DNA de HBV positivo y niveles de transaminasas normales, se recomienda repetir los ensayos cada 5 años. En el caso de DNA de HBV positivo y niveles de transaminasas alterados, se recomienda biopsia para confirmar el proceso inflamatorio y tratamiento antiviral. Finalmente, otra situación que puede generar perfiles atípicos en el laborato-

rio, son las causadas por virus que tienen mutaciones en la región del core y pre-core que codifican el HBeAg. Este antígeno es importante para el desarrollo de la respuesta inmune del individuo y la presencia de los anticuerpos anti-HBe es indicativo de buen pronóstico. Sin embargo, pueden ocurrir casos en que se observa la replicación del DNA viral, con un perfil que sugiere progresión hacia la hepatitis crónica aún en presencia de anti-HBe. Estas mutantes HBeAg (-) pueden encontrarse tanto en pacientes crónicos sintomáticos como en asintomáticos. En estos casos se recomienda pruebas de DNA o biopsia para confirmar el diagnóstico.

### Conclusión

Como se vio, a pesar de que los métodos serológicos para hepatitis B han estado bien difundidos desde hace ya tiempo en la rutina del laboratorio presentando un excelente desempeño diagnóstico, algunas situaciones aún pueden sorprender al médico y al propio profesional del laboratorio, pudiendo conducir a un cuestionamiento de los resultados por falta de información. Cuando se encuentra con alguna situación de este tipo, debe tenerse en mente la posibilidad de estar frente a una "mutante a", de un virus con mutación en la polimerasa o no promotor del HBsAg. Además debe recordarse también la posibilidad de un equilibrio con el sistema inmune o resolución de una infección pasada en los casos donde no se encuentran los marcadores serológicos de infección viral pero se obtiene resultado positivo del DNA de HBV. Las mutantes HBeAg (-) pueden también crear confusión en la interpretación de los resultados. La buena comunicación entre el laboratorio y el médico es la mejor manera de resolver las incógnitas que pueden surgir en estos casos. Finalmente, las ciencias de la salud, como ciencias del área biológica, no siempre obedecen a reglas matemáticas, ni las enfermedades a las reglas estadísticas.



# DIABETES MELLITUS: DIAGNOSTICO Y SEGUIMIENTO

Extracto de:  
*World Health Organization*  
*Laboratory Diagnosis and Monitoring of Diabetes Mellitus, 2002*

**S**e conoce como diabetes mellitus a un grupo de entidades clínicas caracterizadas por un alto nivel de glucosa en sangre (hiperglicemia) resultante de defectos en la secreción de insulina, en la acción de la insulina o ambas. La diabetes mellitus no es una entidad patogénica sino un grupo de defectos metabólicos de distinta etiología. Los síntomas comunes de la diabetes son el letargo causado por la marcada hiperglicemia, poliuria, polidipsia, pérdida de peso, trastornos de visión y susceptibilidad a ciertas infecciones. La hiperglicemia severa puede conducir a síndrome hiperosmolar y la deficiencia de insulina a una cetoacidosis riesgosa para la vida. La hiperglicemia crónica causa daño a largo plazo, disfunción y falla en células de diversos tejidos y órganos.

Las complicaciones de la diabetes a largo plazo son: macroangiopatía (enfermedad cardíaca isquémica, infarto, enfermedad vascular periférica), microangiopatía (retinopatía, nefropatía), cataratas, pie de diabético, corazón de diabético.

### Clasificación de la diabetes mellitus

Existen diversos sistemas de clasificaciones establecidos para la diabetes mellitus. El sistema que actualmente maneja la Organización Mundial de la Salud se basa en la etiología de la enfermedad.

#### Diabetes tipo 1

Anteriormente llamada diabetes infanto-juvenil o diabetes insulino-dependiente. Se caracteriza por una destrucción autoinmune de las células  $\beta$  del páncreas.

Se manifiesta principalmente en la infancia y la adolescencia pero puede ocurrir a cualquier edad.

Se asocia fuertemente con la herencia y se caracteriza por una permanente insulinopenia con propensión a la cetoacidosis.

En el laboratorio se encuentra hiperglicemia, cetonuria, niveles bajos o indetectables de insulina sérica y péptido C.

#### Diabetes tipo 2

Anteriormente diabetes no insulino-dependiente. Se debe a una insensibilidad a la insulina combinada con una falla en su secreción. El organismo intenta compensar la insensibilidad con una hipersecreción, resultando en una deficiencia relativa de insulina. Existe una fuerte predisposición genética. La diabetes tipo 2 es más común en individuos con historia familiar de esta enfermedad, en individuos con hipertensión o dislipidemia, y se ve favorecida por la obesidad, la actividad física reducida y la pertenencia a ciertos grupos étnicos.

Las características de la diabetes tipo 1 y 2 se muestran en la siguiente tabla:

Características	Diabetes tipo 1	Diabetes tipo 2
Edad probable de la enfermedad	< 35 años	> 35 años
Predisposición genética	baja	alta
Anticuerpos contra células $\beta$	sí (90-95%)	no
Estado físico	normal / delgado	obeso
Característica metabólica predominante	deficiencia en insulina	síndrome metabólico con insensibilidad a la insulina
Terapia con insulina	responde	requiere altas dosis
Terapia con drogas secretoras de insulina	no responde	responde

## Diabetes mellitus gestacional

Todas las embarazadas deberían ser controladas respecto a su riesgo de desarrollar diabetes en el embarazo ya que produce complicaciones tales como alteración en la duración del embarazo, falla en la placenta, hipertensión/preeclampsia, recién nacidos de alto peso.

## Laboratorio

El laboratorio tiene un rol esencial en el diagnóstico y manejo de la diabetes mellitus. Los indicadores de laboratorio más comunes para el estudio de esta enfermedad se describen a continuación:

### Determinación de glucosa

Es el indicador más sencillo del metabolismo adecuado de los carbohidratos. Sin embargo, la glucosa se metaboliza rápidamente. Por este motivo, la concentración refleja el estado inmediato del metabolismo y no permite hacer una evaluación retrospectiva del manejo que el organismo hace de la glucosa. Puede medirse en sangre, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.

### Prueba de tolerancia a la glucosa

Se trata de una prueba de estímulo, para examinar la eficiencia del organismo para metabolizar la glucosa. Puede establecer una diferencia entre individuos con metabolismo de glucosa normal, individuos con una tolerancia defectuosa a la glucosa y personas con diabetes. La prueba de tolerancia a la glucosa es más sensible que la glucosa plasmática en ayuno para el diagnóstico de diabetes. Sin embargo el diagnóstico no debe basarse tampoco en una prueba única de sobrecarga de dos horas con resultado mayor a 11,1 mmol/l (>2,00 g/l) sino que debe ser confirma-

do por la repetición de la prueba en días subsiguientes. La prueba de tolerancia no puede ser usada para monitoreo diario de la glucosa. Su utilidad radica más bien en el diagnóstico de alteraciones en el manejo de la glucosa (metabolismo alterado o diabetes gestacional). Esta prueba se ve afectada por stress metabólico en diversas condiciones clínicas y tratamientos como: cirugía mayor, infarto de miocardio, infecciones, síndrome de malabsorción, tratamientos con esteroides, tiazidas, estrógenos, tiroxina, etc.

### Proteínas glicosiladas

Las proteínas reaccionan espontáneamente en sangre con la glucosa para formar derivados glicosilados. Esta reacción ocurre lentamente bajo condiciones fisiológicas y sin la intervención de enzimas. La magnitud de la glicosilación de las proteínas está regulada por la concentración de glucosa en sangre y por el número de sitios amino reactivos presentes en la proteína que está accesible para reaccionar con la glucosa. Todas las proteínas con sitios reactivos pueden ser glicosiladas y la concentración, que puede ser medida en sangre, es un indicador de las fluctuaciones que ha sufrido la glucosa sanguínea durante un cierto período. Desde el punto de vista del diagnóstico clínico las proteínas glicosiladas con una vida media conocida en sangre resultan de gran interés ya que reflejan los niveles de glucosa a los que el organismo estuvo expuesto durante períodos más o menos prolongados.

### Hemoglobina glicosilada

La vida media es de 90 a 120 días. Durante este período se forma la hemoglobina glicosilada A. Esta proteína glicosilada tiene varias subfracciones de las cuales la más útil ha resultado la A1c,

que se utiliza como indicador retrospectivo de la glucosa sanguínea promedio de las 8 a 10 semanas anteriores.

Existe una variedad de sistemas comerciales para determinación de HbA1c, la mayoría de los cuales utilizan métodos cromatográficos. También puede ser determinada por métodos inmunquímicos sin separarla de la hemoglobina no glicosilada aunque puede llevar a una interferencia biológica en algunas condiciones fisiológicas.

Un problema analítico especial puede ocurrir en presencia de hemoglobinas anormales, con las que se obtienen valores de HbA1c anormalmente altos. Resultados falsamente bajos pueden observarse en trastornos hematológicos y disfunción renal. Elevaciones espurias también se han informado en hipertrigliceridemia, hiperbilirrubinemia, abuso de alcohol y tratamientos con aspirina.

### Fructosamina

La albúmina es el componente principal de las proteínas plasmáticas. Como la albúmina contiene grupos amino libres, también ocurre la reacción no enzimática de unión a la glucosa. Por este motivo, la albúmina glicosilada también se utiliza como marcador para el monitoreo de la glucosa sanguínea. Provee información retrospectiva de la glucosa sanguínea promedio de 1 a 3 semanas anteriores a la prueba.

Bajo condiciones alcalinas las proteínas glicosiladas (cetoaminas) reducen el nitroblue tetrazolio (NBT) a formazán. En el test de la fructosamina la absorción de formazán a 530 nm es medida fotométricamente y comparada con un Standard apropiado para determinar la concentración de proteína glicosilada en plasma, la mayor parte de la cual es albúmina. El principio de la reacción es el siguiente:

Cetoaminas  $\rightarrow$  enaminoles + NBT  $\rightarrow$  formazán

La prueba puede verse afectada en algunas condiciones clínicas que comprometan al hígado o los riñones. Habitualmente se la utiliza como parámetro de seguimiento ya que permite conocer el estado de la glucosa promedio entre una y tres semanas previas a la toma de muestra.