

Caracterización molecular del virus de la hepatitis B: eslabón imprescindible en la eliminación de la enfermedad en Cuba.

Autora principal: Licel de los Ángeles Rodríguez Lay

Co-autores: Marité Bello Corredor, Maria C. Montalvo Villalba, Rosmari Rodríguez-Roche, Lidunka Valdes Alonso, Marcia Samada, Susel Sariego Frómeta, Meilin Sánchez Wong, Bárbara Marrero, Vivian KouríCardella, Pedro A. MartínezRodríguez, Elin C. MoraLaguna, Wendy H. Sánchez Puente, Sheyla Moyano Campo, Marlon Rodríguez.

Unidad ejecutora principal: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

5 i hc fU dU fU`U Wtff Yg dcb XY bV U`

@W`XY`cg`â b[Y Yg`F c Xf`i i Yn`@m`

=bgh`ri hc`XY`A YX]W]bU`Hfcd]WU`í DYXfc`?ci f`i`

5 i hc d]ghU`Bcj]U`XY`A YX]c X]U`? a`"*`Ybhf Y7 Uff YhYf U7 Ybhf U`m`

5 i hc d]ghU`BU]cbU`5 dXc`"dcghU`* \$%A Uf]UbUc`%`"

HY fZbc.`)' +&))') (* ž: U .)`' +&\$(*\$)%

7 cff Yc`Y`YWf O]W].`]W`4]d_`g`X`W`

Resumen

Antecedentes: A pesar de los avances en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la hepatitis B, esta enfermedad viral es todavía preocupación de las autoridades de salud en muchos países. El virus de la hepatitis B (VHB) circula en al menos 10 genotipos (gen A – J) y varios subgenotipos y dicha variabilidad da lugar a fenómenos que inciden en la clínica y la epidemiología. **Problema a resolver y objetivos del trabajo:** En Cuba existe poca información acerca de la caracterización molecular del VHB circulante. El presente estudio aporta evidencias científicas que permiten guiar al Programa Nacional de Control de la hepatitis B y el manejo clínico-terapéutico, se implementa una metodología para la vigilancia molecular del VHB en individuos vacunados y contribuye al modelo cubano con vistas a la eliminación de la hepatitis B. Adicionalmente, este estudio permitirá conocer qué genotipos podrían haber estado presentes en África siglos atrás durante la trata de esclavos. **Resultados:** Se estandarizó un sistema de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RCP-TR), para la detección y cuantificación del genoma del VHB con excelente desempeño analítico y clínico. Los genotipos/subgenotipos, serotipos, infecciones mixtas y mutaciones del gen S de 200 muestras positivas al HBsAg y al ADN del VHB correspondientes a 172 pacientes, fueron determinados por secuenciación directa y análisis filogenéticos. Se encontró predominio del genotipo A (92.4%), subgenotipos A2 (84.9%) y A1 (7.6%). Fueron además detectados el genotipo D (7.0%) y el subgenotipo C1 (0.6%), por tanto, se observa un predominio de genotipos del VHB de mejor evolución clínica. La media de las cargas virales de las muestras con genotipo A fue de $1,470E+05$ UI/mL (rango $E+01-08$), mientras que para el genotipo D fue de $6,721E+06$ UI/mL (rango $E+05-07$) sin diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$). Los típicos (sub)genotipos de África Occidental contemporáneos (E, A3 y A5) no se encontraron. Las cepas cubanas estudiadas estaban relacionadas con cepas contemporáneas procedentes de todo el mundo, sugiriendo importaciones recientes múltiples. Treinta y tres pacientes (19.1%) mostraron mutaciones únicas, dobles o múltiples dentro del dominio Hidrofilico principal asociado con escape a la vacuna. Un paciente tenía una infección mixta A1/A2 por el VHB. En conclusión, este estudio genético de las cepas circulantes de VHB cubanas reveló que las mismas están relacionadas con cepas de Europa, América y Asia. La ausencia del genotipo E apoya la hipótesis previa acerca de la introducción reciente de este genotipo en la población general africana. La presencia de mutaciones bien conocidas de escape a la vacuna (3.5%) y de resistencia antiviral (2.9%) justifica la vigilancia de cepas circulantes que guie a la vacunación y a las estrategias de tratamiento. **Publicaciones que avalan el resultado:** Rodríguez L, Montalvo MC, Sariego S, Bello M, Mora E, Kourí V, Martínez PA, Sánchez M, Marrero B. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del ADN del virus de la hepatitis B. *Rev Cubana Med Trop* 2012;64(3). Rodríguez LA, Bello M, Montalvo MC, Sariego S, Sánchez M, Valdés L, Samada M, Sausy A, Hübschen JM, Muller CP. Genetic diversity of the Hepatitis B virus strains in Cuba: absence of West-African genotypes despite the transatlantic slave trade. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0125052 May 15, 10(5):1-12, 2015. Factor de Impacto. 3.23

Comunicación corta:

A pesar de los logros alcanzados en el control y la prevención de la hepatitis B, todavía la infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) impacta de forma significativa en la población mundial. Cuba es un país de baja prevalencia del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) y posee una alta cobertura de vacunación con la vacuna anti-hepatitis B de producción nacional (Heberbiovac HB). La vacuna forma parte del programa Ampliado de Inmunizaciones desde el año 1992 aplicándosele a todos los recién nacidos en la maternidad y a los principales grupos de riesgo de infección por el VHB. Además, por las estrategias seguidas por las autoridades de salud, toda la población menor de 34 años se encuentra actualmente vacunada con dicha vacuna disminuyendo la tasa de infección aguda hasta 0.2/100 000 habitantes.

El VHB es el prototipo de la familia *Hepadnaviridae*, posee un genoma de ADN circular parcialmente bicatenario de 3.200 nucleótidos organizados en cuatro marcos abiertos de lectura. Debido a que la polimerasa viral no posee actividad correctora, el VHB circula en al menos 8 genotipos, llamados genotipos de la A - H, los cuales difieren uno de los otros en al menos 8% de su secuencia nucleotídica completa, y además circula en un número de subgenotipos. Recientemente se han propuesto dos nuevos genotipos: I y J. Estos genotipos poseen una distribución geográfica característica, se correlacionan con la historia de la humanidad y los patrones de migración y se ha sugerido que algunos genotipos están asociados con un curso clínico más severo y una pobre respuesta al tratamiento antiviral. Por tanto, la información acerca del genotipo circulante es de interés para el manejo clínico de la hepatitis B crónica.

El antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) es la lipoproteína más importante de la envoltura. El principal antígeno el determinante 'a' de esta proteína de superficie (amino ácidos (aa) 124 - 147) induce anticuerpos neutralizantes y es la diana de los anticuerpos protectores inducidos por la vacuna. Dependiendo del determinante 'a', las cepas de VHB se agrupan en diferentes serotipos que muestran algunas asociaciones preferenciales con ciertos genotipos. Dentro del dominio Hidrofílico principal (MHD por sus siglas en inglés, aa 99-169) la sustitución G145R es la mutación más común asociada con escape a la vacuna.

El propósito de esta investigación fue identificar los genotipos/subgenotipos, mutantes y variantes genéticas que circulaban en Cuba en una muestra representativa de todo el país. El primer paso fue dirigido a contar con una herramienta de diagnóstico molecular que permitiera identificar en aquellos pacientes HBsAg positivos la presencia de ADN del VHB. En este sentido, particularmente la reacción en cadena de la polimerasa en Tiempo Real (RCP-TR) últimamente ha cobrado mayor interés por el buen desempeño analítico, bajos límites de detección, amplio rango lineal de cuantificación y excelente precisión. A estas ventajas se unen

la rapidez, amplia variedad de plataformas de amplificación y mínimo riesgo de contaminación incluyendo la disminución de los costos.

Para estandarizar la RCP –TR se utilizaron cebadores que amplifican un fragmento del gen C del VHB y sonda de hidrólisis en el equipo *LightCycler 1.5*. Se construyó una curva estándar y se evaluó su eficiencia. Se utilizaron 272 muestras de suero para ensayos de especificidad analítica y clínica, especificidad y exactitud genotípica, coeficientes de variación intraensayo e interensayo, comparación con un estuche comercial y con la RCP-VHB cualitativa.

Una vez montado el sistema se evaluó la curva estándar, la cual mostró excelente correlación lineal ($r=1$) y valores muy bajos de error a lo largo de varias magnitudes de concentración de ADN diana. La especificidad analítica y clínica fue de un 100%, en tanto que al evaluar la especificidad y exactitud genotípica, se obtuvo que las diferencias entre los Log₁₀ del valor obtenido y el de referencia eran inferiores a 0.5 Log₁₀. El límite de detección por análisis de Probit se estimó en 16,41 UI/μL con un rango dinámico de cuantificación de hasta 10⁸ UI/mL. El sistema mostró bajos coeficientes de variación intraensayo (0,16 a 1,45%) e interensayo (0,9 a 2,62%). La comparación con el estuche comercial *artus HBV LC PCR kit* mostró una correlación de $r=0,964$ y $r^2=0,929$ y con la RCP cualitativa confirmó la mayor sensibilidad y ventajas de la RCP-TR. Por todo el desempeño analítico del ensayo concluimos que el mismo cumple con los requisitos para la cuantificación del ADN del VHB, demostrando ser específico, sensible y reproducible y cuya aplicación permitirá un mejor diagnóstico y seguimiento de los pacientes con hepatitis B crónica en Cuba.

Doscientas muestras de suero correspondientes a 172 pacientes positivas al HBsAg y al ADN del VHB fueron recibidos para diagnóstico molecular del VHB durante el periodo 2006 – 2011 procedentes de todo el país. En veinte pacientes 2 o más muestras estaban disponibles. En dichos casos la primera muestra fue usada para análisis de genotipo y serotipo. Las muestras subsiguientes fueron solo incluidas en el análisis solamente si existieron discrepancias con la primera muestra, dígame mutaciones o infecciones mixtas.

Se investigo la diversidad genética de las cepas de VHB colectadas en Cuba en ese periodo. Dicho resultado proporcionaría por primera vez guías para el Programa de Control de las hepatitis virales del MINSAP, ya que la variabilidad del VHB incide en múltiples aspectos del manejo y el control de esta infección, además, existe relación entre el genotipo del VHB infectante y los niveles de ADN viral. Por otro lado, como la población cubana es esencialmente el resultado de la mezcla entre descendientes españoles y antiguos esclavos africanos que fueron deportados a Cuba hasta la segunda mitad del siglo 19, nos daría evidencias científicas del origen de las cepas que circulan en nuestro país y para potencialmente aprender qué genotipos podrían haber estado presentes en África siglos atrás durante la trata de esclavos. Las cepas de

genotipo E típicas de África estarían obviamente ausentes en Cuba, apoyando la teoría de que la introducción de este genotipo ocurrió solamente después que la trata de esclavos termino.

El análisis filogenético de la secuencia del gen S del VHB mostró predominio del genotipo A (92.4%), subgenotipo A2 (84.9%) y A1 (7.6%). Fueron además detectados el genotipo D (7.0%) y el subgenotipo C1 (0.6%), sin embargo, los típicos (sub)genotipos de África Occidental contemporáneos (E, A3 y A5) estaban ausentes. Las cepas de genotipos A, D y C exhibieron características de los serotipos *adw2*, *ayw2* y *adrq* respectivamente. La media de las cargas virales de las muestras con genotipo A fue de 1,470E+05 UI/mL (rango 2.40E+01 – 1,95E+08), mientras que para el D fue de 6,721E+06 UI/mL (rango 4.55E+05 – 2.02E+07) sin diferencias significativas entre ellos ($p > 0.05$).

Treinta y tres pacientes (19.1%) mostraron mutaciones únicas, dobles o múltiples dentro del dominio Hidrofílico principal asociado con escape a la vacuna; dieciocho pacientes (10.5%) tenían mutaciones en el epítipo de células T (amino ácidos 28-51) y habían además otras 111 mutaciones puntuales del gen S. Un paciente tenía una infección mixta A1/A2 por el VHB. Este primer estudio genético de las cepas circulantes de VHB cubanas reveló que las mismas están relacionadas con cepas de Europa, América y Asia. La ausencia del genotipo E apoya la hipótesis previa acerca de la introducción reciente de este genotipo en la población general africana.

La presencia de mutaciones bien conocidas de escape a la vacuna (3.5%) y de resistencia antiviral (2.9%) justifica la vigilancia de cepas circulantes que guie a la vacunación y a las estrategias de tratamiento. Actualmente la vigilancia de fallos vacunales se realiza por métodos serológicos y moleculares. De identificarse una muestra con estas características, se puede realizar la metodología propuesta en este trabajo para confirmar la presencia de mutantes de escape a la vacuna y accionar consecuentemente.

Los resultados exitosos del Programa de Control de la hepatitis B han llevado al pensamiento de lograr la eliminación de esta entidad. Este anhelo se logra por el esfuerzo de las autoridades de salud en conjunto con el desarrollo del polo científico y esta aspiración se concreta en resultados bien establecidos que son: existencia de una excelente vacuna de patente nacional y las estrategias acertadas del Programa Nacional, la creación de una red de laboratorios diagnósticos accesibles para todos, existencia de un laboratorio de referencia y un sistema de vigilancia integrado de las hepatitis virales, establecimiento de una definición de caso que abarca los casos subclínicos, correcto manejo clínico-terapéutico de la entidad, estudios de seroprevalencia en población abierta o en población de riesgo, registro de casos de cáncer de hígado, trasplantados, co-infecciones, entre otros. La caracterización molecular del VHB constituye un dato valioso para enfrentar nuevos retos en el control de esta enfermedad.

IMPACTOS DEL RESULTADO

Científicos y sociales:

1. Las cepas de VHB cubanas son predominantemente del genotipo A, seguido del genotipo D y el subgenotipo C1, observándose una superioridad del genotipo que muestra una mejor evolución clínica y respuesta al tratamiento con interferón pegilado.
2. La mayoría de las secuencias cubanas de genotipo A están relacionadas filogenéticamente con cepas contemporáneas, sugiriendo importaciones recientes múltiples de todo el mundo, más que introducciones por los colonizadores españoles o esclavos deportados a Cuba originarios de África del Este.
3. Aporta datos científicos de valor universal ya que los (sub)genotipos típicos de África Occidental contemporáneos (E, A3 y A5) no se encontraron, lo cual apoya la hipótesis previa acerca de la introducción reciente (< 200 años) de estos genotipos en la población general africana.
4. La presencia de mutaciones descritas que marcan escape a la vacuna y resistencia antiviral, justifica la vigilancia de cepas circulantes, guía las estrategias de vacunación y el manejo clínico-terapéutico.
5. Se normalizó e introdujo en el laboratorio una herramienta diagnóstica para la detección y cuantificación del ADN VHB, que posee características funcionales comparables con sistemas comerciales, que lo avalan para su uso en la caracterización de cepas y en el diagnóstico molecular de la hepatitis B.
6. Aporta datos a la carpeta del modelo cubano con vistas a la eliminación de la Hepatitis B en Cuba.
7. Se cuenta con la metodología para la implementación de la vigilancia molecular del VHB en individuos vacunados.

Los resultados obtenidos están en correspondencia con el Lineamiento 159 para el desarrollo económico y social del país en el que se plantea y cito: "Fortalecer las acciones en la promoción y prevención para el mejoramiento del estilo de vida, que contribuyan a incrementar los niveles de salud de la población con la participación intersectorial y comunitaria". De igual manera el lineamiento 160 que plantea, Garantizar que la formación de especialistas médicos brinde respuesta a las necesidades del país, ya que la estandarización del sistema de PCR en Tiempo Real fue posible por la formación de varios especialistas en esta disciplina en centros de excelencia mundiales, así como, la caracterización del VHB circulante en el Laboratorio de Referencia Nacional de Hepatitis Virales, del IPK fue posible por un entrenamiento que se llevo a cabo en el Instituto de Inmunología de Luxemburgo. El uso de esta herramienta diagnóstica nos ubica a la altura de otros laboratorios homólogos de países desarrollados.