

Bajo impacto de la infección silente por el virus de la hepatitis B en la incidencia de hepatitis postransfusional en Venezuela

Cristina Gutiérrez,¹ Graciela León,² Ferdinando Liprandi¹
y Flor H. Pujol¹

RESUMEN

Objetivo. Detectar la presencia de ADN del VHB en sueros de donantes de sangre negativos en las pruebas de los marcadores serológicos de hepatitis B empleados en el tamizaje, con el fin de evaluar el impacto de la infección silente por VHB sobre la incidencia de hepatitis B postransfusional en Venezuela.

Métodos. Los sueros de 2 075 donantes de sangre negativos en las pruebas de los marcadores serológicos pesquisados en bancos de sangre venezolanos fueron analizados en 53 muestras, compuestas por la mezcla de 25–50 donaciones (0,5–1,0 mL de cada suero). Estas fueron sometidas a ultracentrifugación previa a la extracción del ADN viral por el método de proteinasa K-fenol-cloroformo.

Resultados. En estas mezclas de sueros no se detectó ADN del VHB en ninguno de dos ensayos anidados de reacción en cadena de la polimerasa, mediante cebadores altamente conservados de las regiones que codifican el antígeno de superficie y de la cápside virales. Se observaron niveles normales de aminotransferasas en 98% de 200 sueros evaluados.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que el riesgo de adquirir hepatitis B postransfusional en Venezuela es bajo.

Palabras clave: Hepatitis B, hemotransfusión, bancos de sangre, Venezuela.

Aproximadamente 350 000 000 de personas en el mundo están infectadas con el virus de la hepatitis B (VHB) y un tercio de la población mundial ha estado en contacto con este virus (1). El suroeste asiático y África subsahariana presentan los mayores niveles de pre-

valencia en el mundo (1). En América del Sur se observa una prevalencia intermedia (1–5%), con focos de alta endemicidad, en particular en poblaciones amerindias (2).

El VHB presenta una variabilidad genética mayor que la de otros virus con genoma de ADN debido a su mecanismo de replicación, que involucra una transcriptasa inversa. Se conocen siete genotipos del VHB (identificados con las letras de la A a la G) (3), de los cuales el genotipo F es el predominante en Venezuela y es también el más divergente de los genotipos hu-

manos (4). Se observa igualmente la aparición de variantes y mutantes durante el curso de la infección viral (3).

Se han descrito infecciones ocultas producidas por el VHB que cursan con patrones serológicos inusuales, asociados por lo general con una baja carga de ADN genómico y con la persistencia viral (5, 6). Tal es el caso de las infecciones silentes, caracterizadas por la ausencia de marcadores serológicos del VHB (6, 7). Este tipo de infección parece estar asociado frecuentemente con variantes virales defectuosas en la región del promotor (7–10) y en la re-

¹ Lab. Biología de Virus. CMBC. IVIC. Apdo. 21827, Caracas 1020-A, Venezuela.

² Banco Municipal de Sangre, Caracas, Venezuela. Correspondencia: Dra. Flor H. Pujol, Laboratorio de Biología de Virus, Centro de Microbiología y Biología Celular, IVIC, Apdo. 21827, Caracas 1020-A, Venezuela. Fax: 58-212-5041623. E-mail: fpujol@ivic.ve

gión potenciadora I del gen de la cápside viral (8). Otro patrón serológico inusual es observado en pacientes con infección residual por VHB, que cursa sin antígeno de superficie del virus (AgsHB) detectable y con la presencia de anticuerpos contra su cápside (anti-HBc) (11). En ambos tipos de infección oculta por VHB se ha descrito la presencia de bajos niveles de replicación en el suero, el hígado y las células mononucleares de sangre periférica (5).

El tamizado de la hepatitis B en los bancos de sangre de Venezuela se realiza mediante la determinación conjunta del AgsHB (desde 1973) y de los anticuerpos anti-HBc (desde 1989) (cuadro 1). Este tipo de pesquisa previene la hepatitis postransfusional a partir de donantes con infecciones clásicas o residuales por el VHB. Sin embargo, este tamizado, basado en ensayos inmunoenzimáticos, no permite prevenir por el momento la hepatitis postransfusional causada por donantes con infecciones silentes por el VHB.

En un estudio realizado en Venezuela, previo a la implementación de la determinación de anti-HBc en bancos de sangre, se determinó que la incidencia de hepatitis postransfusional por VHB era de 3,8% (12). Otro estudio realizado recientemente sugirió que alrededor del 10% de las unidades positivas a la prueba de anti-HBc contienen ADN del VHB (13). El descarte de unidades positivas a anti-HBc, así como el perfeccionamiento de los estudios diagnósticos, permiten suponer una reducción significativa en la inci-

dencia de hepatitis B postransfusional en el país actualmente, aunque se desconoce la magnitud de la infección silente en la región.

Por esta razón, el propósito de este trabajo fue detectar la presencia del ADN del VHB en sueros sanguíneos provenientes de donantes de sangre negativos en las pruebas de los marcadores serológicos de hepatitis B empleados en el tamizaje, con el fin de evaluar el impacto de la infección silente por VHB en la incidencia de hepatitis B postransfusional en Venezuela.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Se analizaron muestras de suero de 2 075 donantes de sangre que asistieron al Banco Municipal de Sangre de Caracas entre junio y septiembre de 2000. Las muestras fueron tomadas de forma consecutiva durante distintos días de ese período. Estos sueros resultaron negativos a las pruebas de los marcadores serológicos que forman parte del tamizaje que se realiza en los bancos de sangre venezolanos (cuadro 1).

Análisis bioquímico

A 200 muestras de la población de estudio tomadas de manera consecutiva se les determinaron los niveles séricos de las enzimas aspartato ami-

notransferasa (ASAT), alanina aminotransferasa (ALAT) y γ -glutamilttransferasa (GGT), a través del analizador semiautomatizado Stat Fax^{MR} 1904 Plus (Awareness Technology Inc., Estados Unidos), utilizando métodos cinético-enzimáticos (Chemroy, Canadá; Biochemical Trade, Inc., Estados Unidos).

Detección de AgsHB

Inicialmente se evaluó la conveniencia de someter las muestras a ultracentrifugación antes de la extracción de ácidos nucleicos para recuperar las partículas virales presentes en ellas y favorecer la detección de ADN del VHB mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), contrarrestando así el efecto de dilución causado por la unión de varias muestras. Inicialmente, se evaluó la recuperación de AgsHB —y por ende de las partículas virales— de cuatro sueros de referencia sometidos o no a ultracentrifugación, según un procedimiento descrito (14). Para tal fin, se tomó 1 mL de cada uno de los cuatro sueros de referencia, se diluyeron en 49 mL de suero neonatal bovino (1:50) y se ultracentrifugaron. Se evaluó la presencia de AgsHB en las diluciones de la fase líquida y del sedimento de las muestras, sometidas o no a centrifugación, a través de un inmunoensayo enzimático con anticuerpos monoclonales (15). El análisis de dichas titulaciones se efectuó en paralelo con diluciones seriadas de un suero de referencia con una concentración conocida de AgsHB.

Detección de ADN del VHB

Con las muestras de suero de la población en estudio se conformaron 53 mezclas: 23 de ellas constituidas por la unión de 25 muestras (1 mL de suero de cada una) y 30 compuestas por la mezcla de 50 muestras (0,5 mL de suero de cada una). Estas 53 mezclas de sueros fueron sometidas a ultracentrifugación según el procedimiento descrito (14). El sedimento obtenido fue resuspendido en 700 μ L

CUADRO 1. Prevalencia anual de los distintos marcadores serológicos en las donaciones venezolanas

Marcador	Año					
	1994	1995	1996	1997	1998	1999
Número total de donantes	202 247	202 515	266 828	262 462	262 295	302 100
Anti-HBc (%)	5,18	4,81	4,53	4,41	4,81	4,14
AgsHB (%)	1,44	1,06	0,92	1,00	0,75	0,69
Anti-VHC (%)	—	—	0,75	0,59	0,66	0,67
Anti-VIH (%)	0,21	0,39	0,27	0,28	0,27	0,21
Anti-T. <i>cruzi</i> (%)	1,32	0,84	0,77	0,77	0,78	0,60
VDRl (%)	1,07	1,14	0,90	0,82	0,91	1,03
Total donaciones descartadas (%)	9,22	8,24	8,14	7,87	8,18	7,34

de agua libre de ARNasas y ADNasas, 100 µL de los cuales fueron sometidos a un proceso de extracción de ADN viral a través del método proteinasa K-fenol-cloroformo. Brevemente, 100 µL de cada mezcla de sueros fueron tratados con 25 µg/mL de proteinasa K en 10 mM Tris-HCl, 35 mM EDTA, 0,5% de dodecilsulfato de sodio durante 3 horas a 56 °C. Después de la adición de 12 µg de albúmina sérica bovina (16), el ADN fue extraído con fenol-cloroformo y precipitado con etanol.

La presencia de ADN del VHB fue evaluada a partir de 10 µL de este material resuspendido (20 µL en total), mediante un ensayo de PCR anidada (*nested PCR*), consistente en la amplificación de una secuencia de ADN empleando un par de cebadores, llamados externos, seguida de una segunda amplificación de la región ya amplificada, mediante el empleo de otro par de cebadores internos. De esta forma se logra aumentar la sensibilidad del ensayo en varios órdenes.

Cada una de estas reacciones se efectuó con dos pares de cebadores (cuadro 2) diseñados para amplificar fragmentos altamente conservados de la región S que codifica el gen del antígeno de superficie (17) y de la cápside

(C) del VHB (18, 19), respectivamente. Se utilizaron los cebadores (externos) S₁ y S₂N en la primera PCR para amplificar las regiones conservadas S del VHB. Los cebadores (internos) de la segunda PCR fueron S₆B y S₇P. Cada PCR fue llevada a cabo en un volumen de 50 µL en presencia de 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de una mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos y 3 unidades de polimerasa *Taq* (Gibco-BRL, Estados Unidos).

La primera PCR constó de 40 ciclos con las siguientes especificaciones: desnaturalización a 95 °C por 4 min, alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1,5 min. Después de 5 ciclos, a partir de la segunda desnaturalización (95 °C por 1 min), se procedió a una nueva desnaturalización a 90 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1,5 min durante los restantes 35 ciclos, con un incremento final de la extensión a 72 °C por 4 min. Se utilizó 1 µL del producto amplificado en la primera PCR para la segunda, la cual constó de 30 ciclos con las siguientes condiciones: desnaturalización a 95 °C por 4 min y a 95 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1,25 min y extensión a 72 °C por 1,5 min. Después de 5

ciclos, a partir de la segunda desnaturalización (95 °C por 1 min), se procedió a una nueva desnaturalización a 90 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1,25 min y extensión a 72 °C por 1,5 min durante los restantes 25 ciclos, y un incremento final de la extensión a 72 °C por 5 min.

En la primera reacción de amplificación de la región C del VHB se utilizaron los cebadores (externos) HBVF1 y HBVF2, mientras que en la segunda PCR los cebadores (internos) fueron HBVF3 y HBVF4.

Como controles positivos se utilizaron muestras que habían resultado positivas en pruebas de detección de AgsHB infectadas con el genotipo F.

RESULTADOS

Selección de los cebadores para las PCR

Para conseguir una alta sensibilidad en el ensayo, se escogieron inicialmente los mejores cebadores para las PCR. La evaluación de cuatro combinaciones de cebadores conservados de las regiones virales S y C en 5 muestras de la población evaluada y en 7 mues-

CUADRO 2. Detección de ADN del VHB por PCR: comparación de resultados mediante la utilización de diversos conjuntos de cebadores

Grupos de plasmas sanguíneo evaluados	Positivos / total muestras (%) evaluadas por grupo, según condición ^a			
	Región S (antígeno de superficie)		Región C (cápside)	
	Condición A	Condición B	Condición C	Condición D
Anti-HBc (+) / AgsHB + (n = 7)	6/7	5/7	6/7	5/7
Anti-HBc (+) / AgsHB - (n = 5)	3/5	4/7	4/5	3/5
Total de muestras positivas (n = 12)	9/12 (75,0%)	9/12 (75,0%)	10/12 (83%)	8/12 (66,7%)

^a Cebadores utilizados en cada condición (los dos primeros cebadores corresponden a la primera PCR y los dos últimos a la segunda):

Cebadores A (Carman y col., 1990):

S1(58-77): (5') CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC(3')
 S2N (982-1006): (5') CCCACAATTCTTTGACATACCTTCC(3')
 S6B (130-148): (5') GCACACCGGATCCGAGACTGGGGACCCT(3')
 S7P (825-845): (5') GACACCTGCAGTTAGGGTTAAATGTATACC(3')

Cebadores B (modificado de Carman y col., 1990):

S1 (58-77): (5') CCTGCTGGTGGCTCCAGTTC(3')
 S2N (982-1006): (5') CCCACAATTCTTTGACATACCTTCC(3')
 B117 (119-136): (5') CGTCAATCTCTCGAGGA (3')
 B804a (787-807): (5') GGTAACAGAGGTATAAAGGG (3')

Cebadores C (Zaijier y col., 1994; Lanford y col., 1998):

HBVF1 (1735-1759): (5') TTCAAGCCTCCAAGCTGTGCCTTGG (3')
 HBVF2 (2274-2294): (5') TCTGCGACGCGCGATTGAGA (3')
 HBVF3 (1884-1904): (5') CCTTGGGTGGCTTTGGGGCA (3')
 HBVF4 (2274-2295): (5') AGGATAGGGGCAATTTGGTGGTCTATA (3')

Cebadores D (Carman y col., 1998):

C1 (1737-1756): (5') CGGGATCCGAGGAGTTGGGGGAGGAGATT (3')
 C4N (2462-2481): (5') CCTTATGAGTCCAAGGTATA (3')
 C3a (1768-1788): (5') CGGGATCCCTTTGACTAGGAGGCTGTAG (3')
 C4N (2462-2481): (5') CCTTATGAGTCCAAGGTATA (3')

tras de sueros de referencia del genotipo F, mostró que la detección de ADN del VHB varió entre 66,7% y 83% del total de muestras evaluadas, en dependencia de los cebadores utilizados (cuadro 2). Esta evaluación permitió la elección de dos combinaciones de cebadores altamente conservados de las regiones virales S y C para las PCR anidadas (conjuntos de cebadores A y C, respectivamente), usados posteriormente para el análisis de cada mezcla de muestras del presente estudio. El conjunto de cebadores A fue escogido por la elevada sensibilidad demostrada en la amplificación de fragmentos conservados de la región S del VHB (cuadro 2), la cual ya había sido observada en estudios anteriores (17). Por otra parte, se escogió el conjunto de cebadores C para la amplificación de la región C del VHB, debido a su elevada sensibilidad (83%) en comparación con la obtenida con el conjunto de cebadores D (66,7%). Además, el conjunto de cebadores C usado en ensayos anidados de PCR también ha sido utilizado por otros autores en PCR simples (18, 19), en las que se obtuvo una elevada sensibilidad, similar a la del presente estudio. En particular, se ha reportado el empleo del conjunto de cebadores C para el aislamiento de un hepadnavirus a partir de monos lanudos del Nuevo Mundo (18).

Evaluación de la ultracentrifugación

La ultracentrifugación de la muestra, previa a la extracción de ácidos nucleicos, permitió recuperar eficientemente las partículas virales presentes en las muestras de suero, compensando el efecto de dilución generado por la mezcla de muestras. En los cuatro sueros de referencia sometidos a ultracentrifugación se demostró la presencia en la fase líquida de menos de 5% del AgsHB (y por ende de las partículas virales) presente inicialmente en la muestra, mientras que en el sedimento se encontró más del 95% (datos no mostrados). Estos resultados confirmaron que la ultracentrifugación permite la recuperación de las partículas virales del VHB presentes en el

suero diluido por la mezcla de las muestras.

Detección de marcadores en las muestras de donantes

El cuadro 3 muestra las características de los 2 075 sueros de donantes de sangre, negativos en las pruebas de los marcadores serológicos evaluados. No se detectó la presencia de ADN del VHB en ninguno de los ensayos de PCR anidada. Por otra parte, entre los 200 sueros que se evaluaron bioquímicamente se encontraron 21 muestras con elevación de alguno o varios de los parámetros bioquímicos evaluados. De estos sueros, 2% presentaron elevación de ALAT, con o sin elevación de ASAT, mientras que los niveles séricos de GGT fueron bajos o normales en 90,5% de las muestras analizadas. Tampoco se detectó ADN del VHB en ninguna de las 21 muestras que presentaron niveles elevados de aminotransferasas, evaluadas individualmente.

DISCUSIÓN

En los últimos años se ha demostrado que la infección por VHB puede transcurrir con una baja actividad de transcripción viral (20, 21). El diagnóstico de la infección en tales individuos se hace difícil debido a que las concentraciones de los marcadores virales, tanto en el suero como en el hígado, se encuentran con frecuencia por debajo del límite de detección de los ensayos inmunoenzimáticos utilizados

habitualmente (5). La detección de replicación viral mediante PCR en casos así con infección crónica, evidencia la persistencia del virus en portadores asintomáticos. Las manifestaciones de este tipo de infección pueden variar de una región a otra, ya que podrían depender del contexto epidemiológico, las características inmunológicas del individuo y el contexto genético del VHB.

En este sentido, se ha reportado que las poblaciones autóctonas amerindias están infectadas con el genotipo F del VHB, el más divergente de los genotipos humanos (22) que, además, es el genotipo viral predominante en la población venezolana (3). Esto es importante por las serias implicaciones que puede tener para la salud pública la infección silente y porque este tipo de infección podría estar manifestándose actualmente de diferentes formas, según el contexto epidemiológico.

El empleo de metodologías optimizadas de PCR para muestras sanguíneas provenientes de individuos con infección residual o silente por el VHB, desempeña un papel importante en el aumento de la sensibilidad de esta técnica para la detección de bajos niveles de viremia en los pacientes infectados. En Brasil se encontraron variaciones entre 0 y 50% en la frecuencia de detección de ADN del VHB en sueros de individuos negativos en las pruebas de AgsHB, en dependencia de los cebadores y las condiciones empleadas para la PCR (23). Según estos autores, la implementación de la extracción de ADN por el método fenol-cloroformo con un mayor volumen de muestra, unido al tipo de cebadores utilizado (preferible-

CUADRO 3. Evaluación de infección oculta por VHB en sueros de donantes con marcadores serológicos de hepatitis B negativos (n = 2 075)

Hombres / mujeres (% de hombres) ^a	Edad ^a promedio (recorrido), en años	Muestras con valores elevados de enzimas hepáticas ^b (%)			ADN del VHB
		ASAT	ALAT	GGT	
593/77 (88%)	31,8 (18–59)	4 (2%)	3 (1,5%)	19 (9,5 %)	0/2 075

^a n = 674 muestras consecutivas.

^b n = 200 muestras consecutivas.

ASAT: aspartato aminotransferasa; ALAT: alanina aminotransferasa; GGT: γ -glutamilttransferasa.

mente mediante PCR anidada) aumenta las probabilidades de detectar ADN del VHB en el suero. Estos resultados coinciden con un estudio anterior de los autores, en el cual se observó una mayor frecuencia de detección del ADN del VHB cuando se optimizaron las condiciones de extracción y el volumen de la muestra (13).

En el presente estudio se analizaron las combinaciones óptimas de cebadores para la PCR anidada y se confirmó que el método de ultracentrifugación utilizado permitió la recuperación eficiente de partículas virales, compensando el efecto de dilución ocasionado por la mezcla de las muestras. También se analizaron los niveles de tres marcadores bioquímicos indicadores de inflamación en el tejido hepático —ALAT, ASAT y GGT— de 200 sueros de la población en estudio. Se encontró elevación de alguno de estos parámetros en 10,5% (21/200) de las muestras analizadas, aunque 98% de ellas mostraron niveles normales o bajos de ALAT con o sin alteraciones de ASAT (cuadro 3). Aunque no es posible descartar una causa viral, es probable que los niveles elevados de GGT se deban a otras causas, como el consumo de alcohol en esta población. De acuerdo a los trabajos de Alter y col. (1981), se ha sugerido un valor de ALAT de 70 UI/mL para la exclusión de donaciones de sangre con vistas a prevenir la transmisión de hepatitis por transfusiones (24, 25). En el presente estudio, solo el 0,5% (1/200) de

las muestras analizadas presentó valores de ALAT por encima de este valor de exclusión. En contraste, en un estudio anterior realizado en Venezuela se observó una incidencia de hepatitis B de 5/131 (3,8%) de los receptores de hemoderivados con serología de AgsHB negativa. Se observó también en ese estudio correlación entre los niveles elevados de ALAT en los receptores y la transmisión del VHB (12).

Se ha notificado la presencia de ADN del VHB en el suero de individuos con infección silente desde el punto de vista serológico en países con baja endemicidad de hepatitis B, como Alemania (26) y los Estados Unidos (27). Por otra parte, en países de elevada endemicidad de hepatitis B, como Japón, se han encontrado bajos niveles de ADN viral y mutaciones en el gen *x* del VHB, asociados con la mayoría de las hepatitis crónicas no B, no C, con serología de VHB y VHC negativas (9).

En América Latina se desconoce la magnitud de la infección silente por el VHB. En otros países, como Alemania y Japón, se ha implementado la evaluación de donaciones sanguíneas mediante el uso de técnicas sensibles de amplificación de ácidos nucleicos (NAT) estandarizadas, para la determinación de infecciones por VIH, VHC y VHB durante el denominado "período de ventana" o en la etapa crónica y silente de la infección (28–31). La frecuencia de infección silente por el VHB en todos los estudios realizados hasta

la fecha ha sido extremadamente baja (de 3×10^{-6} a 2×10^{-5}) (30, 31).

En el presente estudio, la determinación de ADN del VHB por PCR en mezclas de muestras de suero de 2 075 donantes de sangre con serología de hepatitis B negativa y con niveles normales o bajos de ALAT y ASAT en su mayoría, no demostró actividad de replicación viral. Aunque el número de muestras analizadas es relativamente bajo, los resultados obtenidos permiten sugerir que la infección silente por VHB no es muy frecuente en la población venezolana de bajo riesgo, como son los donantes de sangre, y apuntan hacia un bajo riesgo de hepatitis B posttransfusional en Venezuela por esta causa. El empleo de cebadores altamente conservados, que garantizan la determinación de distintas variantes del VHB, refuerza la validez de esta conclusión. Sin embargo, se necesitan más estudios de determinación de viremia del VHB en una población de donantes de sangre mayor que la analizada en este trabajo, para determinar la frecuencia de la infección silente en Venezuela.

Agradecimientos. Al doctor Mauricio Salazar, Director del Departamento de Transfusión y Banco de Sangre del Ministerio de Salud y Desarrollo Social de Venezuela, por su valiosa asesoría. Este proyecto fue financiado mediante una asignación especial del IVIC (Fondo Proyectos Aplicados).

REFERENCIAS

- Zuckerman AJ, Zuckerman JN. Current topics in hepatitis B. *J Infection* 2000;41:130–136.
- Torres J. Hepatitis B and hepatitis delta virus infection in South America. *Gut* 1996;38:S48–S55.
- Devesa M, Loureiro C. Variabilidad genética del virus de la hepatitis B y sus implicaciones. *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas* 2000;6:13–28.
- Blitz L, Pujol FH, Swenson PD, Porto L, Atencio R, Araujo M, et al. Antigenic diversity of hepatitis B virus strains of genotype F in Amerindians and other population groups from Venezuela. *J Clin Microbiol* 1998;36:1–4.
- Decker RH. Diagnosis of acute and chronic hepatitis B viral infections. En: AJ Zuckerman y HC Thomas, eds. *Viral hepatitis*. 2nd ed. Nueva York: Churchill-Livingstone 1998:201–217.
- Gutiérrez C. Infección oculta por el virus de la hepatitis B (VHB). *Acta Científica de la Sociedad Venezolana de Bioanalistas Especialistas* 2000;6:29–38.
- Günther S. Naturally occurring variants of hepatitis B virus. *Adv Virus Res* 1999;25:25–137.
- Bock C-T, Malek NP, Tillmann HL, Manns MP, Trautwein C. The enhancer I core region contributes to the replication level of hepatitis B virus in vivo and in vitro. *Virology* 2000;74:2193–2202.
- Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y, Moriyama N, Ishihara S, Chowdhury A, et al. Hepatitis B virus with *x* gene mutation is associated with the majority of serologically "silent" non-B, non-C chronic hepatitis. *Microbiol Immunol* 1996;40: 481–488.
- Bläckberg J, Kidd-Ljunggren K. Genotypic differences in the hepatitis B virus core promoter and precore sequences during seroconversion from HBeAg to anti-HBe. *J Med Virol* 2000;60: 107–112.
- Gandhi MJ, Yang GG, McMahon BJ, Vyas GN. Hepatitis B virions isolated with antibodies to the pre-S1 domain reveal occult viremia in surface antigen-negative/antibody-positive Alaska native carriers by polymerase chain reaction. *Transfusion* 2000;40:2193–2202.
- León G, Sore A, Celis S, Semprún O, Acosta V, Gómez O. Hepatitis posttransfusional. Estudio preliminar. *Sangre* 1991;36:93–97.
- Gutiérrez C, León G, Loureiro CL, Uzcátegui N, Liprandi F, Pujol, FH. Hepatitis B virus DNA in blood samples positive for antibodies to core antigen and negative for surface antigen. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6:768–770.

14. Schuttler CG, Caspari G, Jursch CA, Willems WR, Gerlich WH, Schaefer S. Hepatitis C virus transmission by a blood donation negative in nucleic acid amplification tests for viral RNA. *Lancet* 2000;355:41-42.
15. Pujol FH, Rodríguez I, Devesa M, Rangel-Aldao R, Liprandi F. A double sandwich monoclonal enzyme immunoassay for detection of hepatitis B surface antigen. *J Immunoassay* 1993;14:21-31.
16. Klein A, Barsuk R, Dogan S, Nusbaum O, Shound D, Galum E. Comparison of methods for extraction of nucleic acid from hemolytic serum for PCR amplification of hepatitis B virus DNA sequences. *J Clin Microbiol* 1997;35:1897-1899.
17. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990;336:325-329.
18. Lanford RE, Chavez D, Brasky KM, Burns III RB, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the wolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:5757-5761.
19. Zaijjer HL, Borg F, Cuypers H, Hermus M, Lelie P. Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J Clin Microbiol* 1994;32:2088-2091.
20. Wands JR, Fujita YK, Isselbacher KJ, Degott CS. Identification and transmission of hepatitis B virus-related variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:6608-6612.
21. Maia M, Takahashi H, Adler K, Garlick RK, Wands JR. Development of a two-site immunoprecipitation assay for hepatitis B surface antigen. *J Virol Methods* 1995;52:273-286.
22. Magnus LO, Norder H. Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-Gene. *Intervirology* 1995;38:24-34.
23. Gomes SA, Yoshida CFT, Niel C. Detection of Hepatitis B virus DNA in hepatitis B surface antigen-negative serum by polymerase chain reaction: evaluation of different primer pairs and conditions. *Acta Virol* 1996;40:133-138.
24. Alter HJ, Purcell RH, Holland PV, Alling WD, Kozl DE. Donor transaminase and recipient hepatitis. *JAMA* 1981;246:630-634.
25. Vasconcelos HCFF, Yoshida CFT, Vanderborght BOM, Schatzmayr HG. Hepatitis B and C prevalence among blood donors in the south region of Brazil. *Mem Inst Osw Cruz* 1994;89:503-507.
26. Preisler-Adams S, Schlayer H, Peters T, Hettler F, Gerok W, Rasenack J. Sequence analysis of hepatitis B virus DNA in immunologically negative infection. *Arch Virol* 1993;133:385-396.
27. Feitelson M, Duan LX, Horiike N, Clayton M. Hepatitis B X open reading frame deletion mutants isolated from atypical hepatitis B virus infections. *J Hepatol* 1991;13 (Suppl 4):S58-S60.
28. Abe A, Inoue K, Tanaka T, Kato J, Kajiyama N, Kawaguchi R, et al. Quantitation of hepatitis B virus genomic DNA by real time detection PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37:2899-2903.
29. Saldanha J. Validation and standardization of nucleic acid amplification technology (NAT) assays for the detection of viral contamination of blood and blood products. *J Clin Virol* 2001;20:7-13.
30. Japanese Red Cross NAT Screening Research Group. Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors. *Jap J Infect Dis* 2000;53:116-123.
31. Roth WK, Buhr S, Drosten C, Seifried E. NAT and viral safety in blood transfusion. *Vox Sang* 2000; 78 (Suppl 2):257-259.

Manuscrito recibido el 9 de julio de 2001. Aceptado para publicación, tras revisión, el 21 de septiembre de 2001.

ABSTRACT

Low impact of silent hepatitis B virus infection in posttransfusion hepatitis in Venezuela

Objective. Silent infection by hepatitis B virus (HBV) occurs in the absence of serological markers for the virus. This type of occult infection is generally chronic, asymptomatic, and associated with low levels of viral replication. This study determined the presence of HBV DNA in the sera of blood donors who were negative for serological markers that were tested during screening, with the goal of evaluating the impact of silent HBV infection in posttransfusion hepatitis B in Venezuela.

Methods. A total of 2 075 sera were tested in 53 serum pools of 25-50 donations (0.5-1.0 mL from each sample). The pools were subjected to ultracentrifugation prior to DNA extraction by the proteinase K, phenol/chloroform method.

Results. No HBV DNA was found in any of the pools by nested polymerase chain reaction, using primers for highly conserved regions of the genes that code for the surface antigen and for the viral capsid. Aminotransferase levels were normal in 98% of 200 sera that were tested.

Conclusions. These results suggest that there is a low risk of acquiring posttransfusion hepatitis B in Venezuela.