

Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"

## **EVALUACIÓN BIOQUÍMICO-INMUNOLÓGICA DE INFECTADOS CRÓNICOS POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B: COMPORTAMIENTO DE LA RESPUESTA INMUNE EN SUS CONTACTOS FAMILIARES**

*Dr. Jorge Arturo Santiesteban Torres, Dra. Alina Alerm González, Dr. Antonio González Griego, Lic. Lien López Matilla y Téc. Lidia Caridad Marin Padrón*

### **RESUMEN**

La infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) es una clara e importante causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. Un importante problema para el control y la erradicación de la enfermedad es la existencia de los portadores crónicos del VHB, así como sus contactos familiares. Se realizó un estudio bioquímico-inmunológico a reservorios crónicos del VHB, para determinar asociación entre la concentración del antígeno de superficie del VHB (AgsHB), detectado y cuantificado por un método ELISA, y del ADN viral circulante en suero, así como la correlación entre los niveles de antigenemia y los valores de transaminasas (ALAT). Se demostró asociación de tipo directa entre la carga viral y los niveles de AgsHB, al igual que la concentración de éste y los valores de ALAT. Se observó un porcentaje significativo de portadores con altas cargas virales y niveles normales de enzimas. Se analizó el comportamiento de la respuesta inmune frente al virus en los contactos familiares del infectado crónicamente y se estimó la frecuencia de aparición de inmunes, susceptibles e infectados; resultó un elevado número de infectados y conviventes sin evidencia de protección. Se evaluó la respuesta de anticuerpos (anti-AgsHB) frente al AgsHB (ELISA cualitativo y cuantitativo), inducida por la vacunación o por contacto natural entre conviventes consanguíneos y no consanguíneos, se comprobó que no difirió entre ellos. Se determinó asociación entre la concentración del AgsHB del portador con los niveles de anti-AgsHB, después del esquema completo de vacunación en consanguíneos y no consanguíneos, resultó ser de tipo negativa en los primeros lo que infiere la existencia de genes compartidos relacionados con el control de la respuesta anti-AgsHB y con el aclaramiento viral.

*Descriptores DeCS:* VIRUS DE LA HEPATITIS B/inmunología; HEPATITIS B CRONICA/inmunología; ANTIGENOS DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B/inmunología; TRANSMISION DE ENFERMEDAD; RESERVORIOS DE ENFERMEDADES.

La hepatitis B (HB) constituye uno de los principales problemas de salud en el mundo, se ha reportado que 1 000 000 000 de

personas, o sea la quinta parte de la población mundial tiene evidencias serológicas de la infección,<sup>1</sup> y se estima

que 350 000 000 mantienen el estado de portador del virus; éstos se consideran los reservorios de la infección, que se distribuyen en diferentes áreas geográficas con prevalencias variables.<sup>2,3</sup> La importancia de la enfermedad se magnifica si se tiene en cuenta que por año, se infectan más de 50 000 000 de personas, se producen como mínimo 250 000 casos nuevos de cáncer de hígado atribuible al virus de la hepatitis B (VHB)<sup>4,5</sup> y ocurren más de 1 000 000 de defunciones como consecuencia de las secuelas de la infección viral.<sup>6</sup> La infección por el VHB se manifiesta desde un estado de portador asintomático hasta la hepatitis aguda autolimitada, la forma fulminante y la enfermedad crónica del hígado.<sup>7</sup>

Se conoce que el VHB por sí mismo no es citopático. Los síntomas y signos de la enfermedad son consecuencia de la inmunorreacción del huésped; por tanto, mientras más intensa sea la respuesta inmune, mayor será la inflamación hepática y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, con la elevación de un grupo de enzimas llamadas de citólisis; entre las que se encuentran la aspartato amino transferasa (ASAT) y alanina amino transferasa (ALAT), cuyo estudio es de gran utilidad para evaluar la lesión hepática.<sup>8,9</sup> En el estadio agudo, se elevan durante el período de incubación y están aumentadas de forma constante una vez que aparecen los síntomas, ya el antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB) se puede detectar en suero algunas semanas antes de este aumento. La presencia de la actividad de las amino transferasas durante más de 6 meses, casi siempre indica una evolución hacia la cronicidad, donde están en general ligeramente elevadas y de forma eventual se encuentran en un rango normal.<sup>10</sup>

Los patrones de transmisión difieren en las distintas regiones geográficas. En países con alta y media endemicidad, la

forma de transmisión más común es la denominada vertical (madre a hijos) y la horizontal que ocurre mediante el contacto de padres portadores con sus hijos, entre niños, o entre hermanos. Por el contrario, en los países con baja endemicidad, la mayoría de las infecciones aparecen en etapas posteriores de la vida, fundamentalmente en la adolescencia y la edad adulta, donde prevalecen los patrones de transmisión sexual y el abuso de drogas intravenosas (vía parenteral).<sup>11,12</sup>

A la transmisión conocida clásicamente como la vía parenteral hay que adicionar otras vías no siempre tenidas en cuenta como son las lesiones de piel y mucosas. Con respecto a esto último se ha encontrado AgsHB en lesiones impetigosas y por escabiosis, y en los fluidos gingivales de los portadores crónicos, por lo que deben ser consideradas como fuente de diseminación a través de vías inaparentes de infección.<sup>12,13</sup>

Un hecho importante que modifica los criterios epidemiológicos actuales de la enfermedad, es que 30 a 40 % de los pacientes en EE.UU. no tienen asociación entre la infección y un factor de riesgo detectable,<sup>14</sup> y que entre los adolescentes infectados, 60 % no pudo identificar la fuente de la infección, aun cuando la actividad heterosexual se considere la causa más común.<sup>15</sup>

Se ha demostrado la tendencia al agrupamiento familiar donde hay individuos con altas prevalencias del AgsHB y que, hijos de madres AgsHB negativas e incluso con anti-AgsHB, pero con un padre portador, se infectaron con el virus y evolucionaron hacia formas crónicas de la enfermedad; esto ha hecho pensar que se combinó un doble riesgo para la infección, por una parte un factor genético que condicionaría la mayor tendencia a la infección y por otra

una elevada exposición.<sup>16</sup> Otro importantísimo problema para el control y en especial para la erradicación de la enfermedad, es la existencia de los portadores crónicos, pues ellos constituyen una fuente permanente de infección, así como sus contactos familiares.

No existen evidencias concluyentes de la influencia de la exposición constante al VHB sin que se produzca la infección, de la asociación entre los niveles del AgsHB, concentración del ADN y comportamiento de los niveles de las enzimas hepáticas en los individuos infectados crónicamente; ni si la respuesta de anticuerpos (anti-AgsHB) por contacto natural o inducida por la vacunación en los consanguíneos convivientes de los reservorios crónicos difiere en los no consanguíneos, así como la relación de las concentraciones del AgsHB del portador del VHB con los niveles de anti-AgsHB inducidos por la vacunación en sus convivientes. En el presente trabajo se tratan de esclarecer estas interrogantes.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio *descriptivo de corte transversal* en pacientes diagnosticados como portadores crónicos del VHB, dado por la persistencia del AgsHB por más de 24 semanas, con valores normales, alterados o fluctuantes de las enzimas marcadoras del daño hepático (ALAT) y manifestaciones clínicas o no, así como en sus convivientes.

### *Muestra*

Se estudiaron 111 reservorios crónicos del virus de la hepatitis B; 189 de sus convivientes, de los cuales 142 eran sus

consanguíneos y 47 no consanguíneos. Los pacientes procedían de los servicios de atención secundaria, de las consultas de gastroenterología del Hospital Provincial de Pinar del Río y del Hospital "Carlos J. Finlay" de Ciudad de La Habana.

### *Técnicas, procedimientos y métodos*

*Estudios epidemiológicos:* Se realizó una entrevista para estimar las posibles vías de transmisión mediante la identificación de exposición parenteral, tanto por vía sanguínea o por contacto sexual, a través de la transmisión intrafamiliar (horizontal) o perinatal (vertical).

*Estudios clínicos:* Se registraron los síntomas y signos de las formas crónicas de la enfermedad como íctero, astenia, anorexia y hepatoesplenomegalia.

*Estudios bioquímicos:* niveles enzimáticos de alanino amino transferasa, como marcadora específica de lesión hepática según método de Reitman Frankel, *nivel de referencia* menor que 12 UI/L.<sup>17</sup>

*Estudios inmunológicos:* Evaluación serológica de la presencia o ausencia del AgsHB y anti-AgsHB, así como de sus concentraciones, con la utilización de 2 métodos inmunoenzimáticos basados en el principio heterogéneo tipo *sandwich*, producidos, desarrollados y validados en el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón" en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Límite de detección exigido para el AgsHB: 1 ng/mL<sup>18</sup> (Izquierdo M. Validación del método inmunoenzimático [ELISA] para la cuantificación del antígeno de superficie de la hepatitis B. Biotecnología Habana '94. [Reportes cortos del congreso]. 1994; 2: 42). Límite de detección exigido para el anti-AgsHB: 4 UI/L (López Pradere A, Alerm A, González

Griego A. Estudio clínico-inmunológico de infectados por el virus de la Hepatitis B [Tesis para optar por el título de Especialista de I Grado en Medicina Interna] Habana. 1993, 40 pp) (García M, Alerm A. Desarrollo de un método inmunoenzimático para la detección y cuantificación de anticuerpos específicos para el AgsHB [Tesis para optar por el título de Especialista de I Grado en Inmunología] Ciudad de La Habana: ICBP "Victoria de Girón". 1994, 50 pp.).

Los niveles de antigenemia medida en concentración del AgsHB se clasificaron en 4 categorías:

- Bajas: menor que 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Medias: entre 2-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Altas: entre 11-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- Muy altas: mayor que 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La respuesta anti-AgsHB se clasificó por las concentraciones de anticuerpos dirigidos contra la proteína de cubierta del AgsHB del VHB en:

- Seroconversión: menor que 10 UI/L.
- Seroprotección: entre 10-100 UI/L.
- Hiperrespuesta: mayor que 100 UI/L.

La cuantificación de la viremia medida por concentración del ADN circulante en suero se realizó mediante el método Cuanti-DNA (quantiplex, Chiron, Biolchner), Colombia. Nivel mínimo de detección: 0,7 mEq/mL o 2,5 pg/mL. Nivel máximo de detección: 6 800 mEq/mL o 24 000 pg/mL.

#### *Diseño metodológico*

Una vez detectado un portador crónico en los servicios de atención secundaria se remitió a la consulta especializada en *hepatopatías* radicada en el Departamento de Inmunología (ICBP "Victoria de Girón")

donde se realizaron los estudios definidos antes. Se procedió a citar y estudiar a todos los convivientes, se les determinó la presencia de marcadores virales en suero. En el caso de ser positivo para el AgsHB se cumplieron los estudios epidemiológicos, clínicos y bioquímicos. Aquéllos en los que se detectaron anticuerpos específicos para el antígeno de superficie del VHB se consideraron inmunes, con anticuerpos inducidos de forma natural. Los que no presentaron en suero, ni anti-AgsHB ni AgsHB, se clasificaron como susceptibles y fueron inmunizados con la vacuna cubana anti-hepatitis B (HEBERBIOVAC HB) producida en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, con el empleo de una dosis de inmunización de 20  $\mu\text{g}$  AgsHB/dosis y un esquema de 3 inóculos, separados por un intervalo de 1 mes (0-1-2) por vía intramuscular profunda en la región deltoidea.

La evaluación de la respuesta a la vacunación se realizó 15 d después de la última dosis para medir los niveles de anticuerpos alcanzados una vez finalizado el esquema. En los convivientes inmunes o susceptibles vacunados en quienes no se observó respuesta protectora, se aplicó una dosis de refuerzo.

Para determinar la asociación entre el ADN viral y el AgsHB y el comportamiento de éste con respecto a los niveles de ALAT se utilizó un *test* de correlación simple con su respectiva prueba de significación.

Para evaluar la respuesta anti-AgsHB, los convivientes se clasificaron en 4 grupos de acuerdo con el tipo de respuesta: por contacto espontáneo o inducida por la vacunación, y consanguíneos y no consanguíneos. Se estratificaron a su vez en sexo masculino y femenino y según la edad en los grupos siguientes: menores de 14 años,

entre 15 y 34 años, y 35 años y más, por la importancia que poseen estas variables en la respuesta inmune. Se comparó, mediante análisis estadístico descriptivo, la concentración de anticuerpos (transformada y no transformada logarítmicamente) entre los diferentes grupos. Se ajustó un modelo lineal (análisis de la varianza de 2 vías), en el que la variable dependiente fue la concentración de anti-AgsHB y como independientes: sexo, edad, grado de consanguinidad, y tipo de respuesta; para poder inferir el efecto de estas variables sobre la primera. Los porcentajes de seroconversión fueron igualmente comparados para los diferentes grupos de acuerdo con los criterios de clasificación de la respuesta anti-AgsHB.

La clasificación de los reservorios de acuerdo con los niveles de antigenemia (concentración de AgsHB) dio lugar a 4 grupos. Esta agrupación permitió reducir la dispersión que caracterizó las cifras del AgsHB. La media geométrica de las concentraciones de anticuerpos de los convivientes, se relacionó con la media de las concentraciones del AgsHB del portador crónico. Se procedió a realizar análisis de varianza de una vía para comparar los niveles de anticuerpos de los familiares con la variable transformada logarítmicamente y sin transformar, tanto en consanguíneos como en no consanguíneos. Esto permitió conocer la influencia de la concentración del AgsHB del reservorio sobre los niveles de anticuerpos de sus contactos familiares.

## RESULTADOS

El estudio realizado a los reservorios crónicos demostró la existencia de antecedentes epidemiológicos en 14 casos, lo que constituyó 12 % de la población estudiada

y del total de infectados sólo 5,4 % presentó manifestaciones clínicas evidentes

Prevalcieron las concentraciones del AgsHB altas y muy altas, que equivaldrían a 67,6 % en comparación con los niveles de antigenemia medios y bajos (tabla 1).

Los estudios de correlación del ADN viral en suero y la concentración del AgsHB en 30 portadores crónicos, demostraron una asociación muy significativa ( $R = 0,542$   $p = 0,002$ ) entre ambas variables, donde altas concentraciones del AgsHB corresponden con altos niveles de viremias (ADN-VHB). Por el escaso número de muestras no se pudieron correlacionar los rangos de concentración del AgsHB con respecto al ADN viral.

Al analizar la correlación entre los niveles enzimáticos de ALAT y la concentración del AgsHB, se encontró una asociación positiva ( $R = 0,384$   $p = 0,001$ ) con una relación de tipo directa entre ambas variables, no se obtuvo el resultado esperado.

Al comparar la frecuencia de aparición de cifras de ALAT en relación con la presencia o ausencia de ADN viral (tabla 2), se encontró que el mayor porcentaje y de forma significativa ( $X^2 = 0,782$   $p < 0,05$ ), correspondió a los infectados crónicos con niveles enzimáticos dentro de los límites normales y ausencia de ADN viral circulante en suero (76 %). Se pudo observar además un alto porcentaje (61,5 %) de infectados con partículas virales circulantes en suero y que no presentaron alteraciones en los niveles enzimáticos.

En la tabla 3 se observa el análisis estadístico descriptivo para el estudio de los convivientes del reservorio del VHB donde se detectó 33,3 % de inmunes, 112 susceptibles para 59,3 % y 14 casos infectados con 7,4 % del total de prevalencia de infección.

TABLA 1. Distribución de la antigenemia medida por la concentración del antígeno de superficie de la hepatitis B (Ag<sub>s</sub>HB) en portadores crónicos del virus de la hepatitis B

Concentración del Ag <sub>s</sub> HB	No.	%
Menor que 1 µg/mL	13	11,7
Entre 2-10 µg/mL	23	20,7
Entre 11-100 µg/mL	52	46,9
Mayor que 100 µg/mL	23	20,7
Total	111	100

TABLA 2. Asociación entre ADN viral y valores enzimáticos de ALAT

Valores enzimáticos	ADN negativo		ADN positivo	
	No.	%	No.	%
Normales	13	76,0	8	61,5
Alterados	4	24,0	5	39,5
Total	17	100	13	100

TABLA 3. Estudio serológico de los convivientes

Convivientes	No.	%
Inmunes	63	33,3
Susceptibles	112	59,3
Infectados	14	7,4
Total	189	100,0

Las formas de transmisión entre el caso índice y los convivientes infectados parecieron ser el contacto de padres portadores con sus hijos (3/14) y entre hermanos (4/14); así como perinatal, donde 5 de 14 convivientes infectados eran hijos de madres portadoras.

Como se puede observar en la tabla 4, la distribución de la concentración del anti-Ag<sub>s</sub>HB en categorías de seroprotección e hiperrespuesta no difirió entre la respuesta espontánea (por contacto natural) y la inducida por la vacunación.

TABLA 4. Distribución de la concentración de anti-Ag<sub>s</sub>HB de la respuesta espontánea e inducida por la vacunación

Categorías	Respuesta espontánea		Respuesta inducida	
	No.	%	No.	%
Seroprotección	63	100	109	97,3
Hiperrespuesta	36	57,2	62	54,8
Hiporespuesta	0	0	3	3,3

Al estratificar esta respuesta mediante la relación genética entre el portador crónico y los convivientes, no se observaron diferencias porcentuales significativas en la distribución de la concentración del anti-Ag<sub>s</sub>HB entre los consanguíneos y no consanguíneos (tabla 5).

Al comparar la respuesta espontánea y la respuesta inducida por la vacunación no hubo significativamente diferencias entre las medias geométricas de las concentraciones de anti-Ag<sub>s</sub>HB, para los consanguíneos, convivientes del portador crónico y los no consanguíneos (tabla 6).

Durante el ajuste estadístico de un modelo lineal en que la variable dependiente lo constituyó la respuesta de anti-Ag<sub>s</sub>HB, y como independiente el grado de consanguinidad, se encontró que no hubo efecto en los diferentes grupos (respuesta en consanguíneos y no consanguíneos de forma natural e inducida por la vacunación) sobre esta variable ( $p = 0,265$   $F = 1,337$ ).

Al correlacionar la concentración del Ag<sub>s</sub>HB de los casos índices con la respuesta anti-Ag<sub>s</sub>HB inducida por la vacunación en convivientes consanguíneos y no consanguíneos, se encontró una fuerte asociación negativa entre las concentraciones de antígenos del caso índice y las de anti-Ag<sub>s</sub>HB en los consanguíneos ( $R = 0,567$   $p = 0,04$ ). En el caso de los no relacionados genéticamente (no consanguíneos) existió también asociación, pero de tipo positiva ( $R = 0,561$   $p = 0,092$ ) (tabla 7). En el caso de la respuesta inducida natural-

TABLA 5. Distribución de la concentración de anti-AgsHB entre respuesta espontánea y respuesta inducida por la vacunación en consanguíneos y no consanguíneos

Categorías	Respuesta espontánea				Respuesta inducida por la vacunación			
	Consanguíneos		No consanguíneos		Consanguíneos		No consanguíneos	
	No.	%	No.	%	No.	%	No.	%
Seroprotección	51	100	12	100	75	97,4	34	97,1
Hiperrespuesta	31	60,8	5	42,0	48	55,8	19	54,2
Hiporespuesta	0	0	0	0	2	2,7	1	3,0

TABLA 6. Comparación de las concentraciones de anti-AgsHB en consanguíneos y no consanguíneos según tipo de respuesta

Concentración anti-AgsHB(UI/L)	Respuesta espontánea		Respuesta inducida por la vacunación	
	Consanguíneos	No consanguíneos	Consanguíneos	No consanguíneos
Medias transformadas	4,991	4,625	4,625	4,750
Valor mínimo	2,565	2,197	2,197	2,565
Valor máximo	6,980	6,932	6,006	6,260
Desviación estándar	1,036	1,558	0,739	0,987
Coefficiente variación	0,208	0,337	0,160	0,208

TABLA 7. Distribución de la respuesta anti-AgsHB inducida por la vacunación según concentración de AgsHB en consanguíneos y no consanguíneos

Rango de concentración del AgsHB	Concentración de anti-AgsHB (UI/L)			
	Consanguíneos		No consanguíneos	
	No transformada*	Transformada*	No transformada*	Transformada*
< 1 µg/mL	474	5,838	-	-
2-10 µg/mL	215	5,177	20	2,848
11-100 µg/mL	143	4,829	137	4,565
> 100 µg/mL	85	4,219	203	5,038

(\*) Transformación logarítmica.

(-) Ausencia de conviventes incluidos dentro de este rango.

mente, el tamaño de la muestra no permitió realizar este tipo de análisis.

Cuando se analizaron de forma cualitativa las diferencias de la variable grupos de acuerdo con sus 2 factores contribuyentes como son la consanguinidad y la respuesta anti-AgsHB, bien de tipo natural o inducida por la vacunación, resultó importante el segundo; es decir que el responsable de las diferencias entre los grupos se debió al tipo de respuesta ( $p = 0,007$

$F = 7,693$ ) donde la concentración de anticuerpos dirigidos contra la proteína de cubierta del VHB fue superior en los vacunados con respecto a los que desarrollaron una respuesta espontánea.

Se demostró una interacción significativa entre sexo/grupo ( $F = 3,873$   $p = 0,011$ ) con respecto a la respuesta anti-AgsHB. Al analizar la influencia del sexo sobre la variable anti-AgsHB se observó asociación significativa ( $F = 3,813$   $p = 0,012$ ) y

manifestó una mejor respuesta el sexo femenino. Sin embargo no se pudo demostrar asociación entre las variables edad/respuesta anti-AgsHB ( $F = 2,658$   $p = 0,108$ ).

## DISCUSIÓN

El bajo número de portadores con antecedentes epidemiológicos constituyó un hecho importante que indujo a pensar que no existió asociación entre la infección y un factor de riesgo detectable, se comportaron de forma similar a los estudios realizados en EE.UU. donde de 30 a 40 % de los pacientes estudiados desconocía la forma en que se infectó y 60 % de los adolescentes portadores no pudo identificar la fuente de infección.<sup>13</sup>

El alto porcentaje de pacientes asintomáticos pasaría de forma inadvertida, los que no acuden a los servicios médicos y por lo tanto no son diagnosticados. Esto, unido a las altas antigenemias (tabla 1) y viremias (carga viral) detectadas en ellos, hacen que constituyan un elevado potencial de transmisión de la enfermedad, muchas veces inaparentes.

La distribución de la antigenemia medida por la concentración del AgsHB en los portadores del VHB (tabla 1) refuerza los estudios de pesquiasaje de población abierta realizado por el departamento de inmunología, donde predominaron significativamente niveles altos y medios del AgsHB para 66 % (González Griego A, Alerm A, Ramírez V. Nueva estrategia que contribuye a vincular la atención primaria de salud a un centro universitario. Forum de Ciencia y Técnica Nacional, 1997).

El estudio de correlación del ADN viral y el AgsHB en suero de portadores del VHB infiere que altas concentraciones del AgsHB se asocian con altos niveles de

viremia y por lo tanto una elevada infecciosidad; a partir de que cifras superiores a  $10 \mu\text{g/mL}$ , corresponden a las de  $7\,000 \times 10^6$  Eq/mL de material genético viral (ADN). En términos moleculares, cada microgramo de AgsHB corresponde a  $2,2 \times 10^6$  moléculas (PM  $27 \times 10^3$  número de avogadro) y cada partícula está constituida casi por 100 moléculas de AgsHB. Si 1 de cada 1 000 constituye un virión completo,  $2,2 \times 10^{11}$  sería el número de partículas infectantes, por cada microgramo de AgsHB detectado.<sup>19</sup>

Cuando se analiza integralmente la respuesta a la infección, hay que considerar que la recuperación es dependiente del sistema inmune del individuo. Se sabe que el virus no tiene carácter citopático, sino que una respuesta celular antígeno-específica es capaz de desencadenar una serie de mecanismos efectores inespecíficos que producen lisis de las células infectadas y neutralización de los viriones; esto impide la penetración e infección de las células sanas. En esta respuesta están involucrados componentes genéticos representados por haplotipos HLA presentes en las células de los individuos, así como en las características de los linfocitos T, que desempeñan su papel en el reconocimiento y en las citólisis de las células infectadas por el virus.<sup>20,21</sup> Por lo tanto, la evolución de la enfermedad a la cronicidad está en relación, entre otras causas, con una disrespuesta al virus dada por: a) una supresión inmune selectiva de la proliferación de linfocitos  $\text{CD}_4$  intrahepáticos por células  $\text{CD}_8$ , b) la eliminación de linfocitos B específicos de envolturas por LTC restringidos MHC I,<sup>22,23</sup> y c) la presencia de células  $\text{TH}_0$  con doble patrón de citocinas, donde el efecto antiviral protector  $\text{TH}_1$  para la resolución completa de la infección puede ser contrarrestado por la influencia concomitante de los efectos de las citocinas

TH<sub>2</sub>, y se inhibe la expansión de la población de células T efectoras para el aclaramiento del virus.<sup>24</sup> Las elevadas cifras de antigenemia podrían ser consecuencia de una replicación no controlada por la respuesta inmune ineficiente.

Teniendo en cuenta que el virus no es citocida y que el daño hepatocelular es causado por la respuesta inmune con la subsiguiente liberación de ALAT y ASAT, debía esperarse que a una respuesta más eficiente le correspondiese una mayor inflamación hepática y niveles enzimáticos más elevados. Era de suponer entonces que aquellos portadores crónicos con altas cifras de antigenemia, consecuencia de una replicación viral no controlada por una respuesta inmune ineficiente entre otras causas, mostraran valores enzimáticos inferiores a aquéllos que presentaran bajas concentraciones del AgsHB sérico. Hipótesis que no se pudo demostrar durante el análisis de correlación entre los niveles de ALAT y la concentración del AgsHB en suero de portadores del VHB.

Se podría pensar que este tipo de comportamiento estuvo en relación con la forma puntual en que se tomaron las muestras, coincidió tal vez con el momento de mejor respuesta a la infección, con el subsecuente trastorno en la permeabilidad, daño y ruptura de las células hepáticas y la liberación al suero de cantidades elevadas de enzimas intracitoplasmáticas y proteínas virales, dentro de las que se encuentran las de envolturas. Otra posible explicación, quizás más plausible, sería que en estos pacientes la masa de células infectadas es mayor, se sintetizan altas cantidades de AgsHB y aunque la respuesta inmune no sea lo suficientemente eficiente, la lesión inflamatoria, causada por la inmunorreacción del huésped, se extenderá a mayor área del parénquima hepático con la subsecuente elevación de las aminotransferasas, a pesar

de que el índice de actividad enzimático por célula sea bajo.<sup>20</sup>

La alta frecuencia de aparición de infectados con niveles enzimáticos normales y ADN negativo corrobora los estudios realizados por *Ganem* y *Varnus*<sup>19</sup> donde se demostró que en los portadores asintomáticos del VHB sin lesión hepática y con niveles de ALAT normales, las partículas libres o redundantes (esférica o filamentosa) se encuentran presentes en mayor proporción (exceso de 10<sup>3</sup> a 10<sup>6</sup>) con respecto de las formas completas, es decir, partículas de Dane. El porcentaje significativo de infectados con partículas virales circulantes en suero y que no presentaron alteraciones en los niveles enzimáticos, hace que pasen de forma inadvertida frente a los sistemas de vigilancia y atención clínica, y de esta forma constituyen un foco inaparente de diseminación de la enfermedad.

Durante la evaluación serológica de los convivientes era de suponer que el porcentaje de prevalencia de infectados fuera superior y no estuviera cerca del rango encontrado en los bancos de sangre reportados por el MINSAP (Ministerio de Salud Pública. Cuba. Dirección Nacional de Epidemiología. La hepatitis B en Cuba. [Informe anual].1998) (0,98 %), porque la inmensa mayoría de los portadores crónicos así como sus contactos familiares provienen de una de las áreas de mayor endemidad del país con respecto al promedio nacional (Pinar del Río), y manifiestan una tendencia a la diseminación intrafamiliar. Estos resultados refuerzan los estudios realizados por *Papaevangelou* y otros<sup>25</sup> donde la tasa de portadores entre los convivientes del infectado crónico fue de 18,3 % y los hechos por *McMahon* y *Wainwright* acerca de altas prevalencias del AgsHB (13,9 %) con grandes evidencias de agrupamiento familiar, encontradas du-

rante el establecimiento de un programa de control para la erradicación de la enfermedad.<sup>26</sup>

El elevado porcentaje de susceptibles encontrados pone de manifiesto la importancia de modificar el control epidemiológico tradicional, de forma tal que los no protegidos en contacto con el caso índice sean vacunados y pueda de esta manera cortarse la cadena de diseminación de la infección.

La forma más común de transmisión entre el caso índice y los conviventes infectados pareció ser, el contacto de padres portadores con sus hijos (3/14) y entre hermanos (4/14). Sin embargo, en estos últimos sólo se pudo confirmar la verdadera transmisión de tipo horizontal en un solo caso de los hermanos, al ser hijos de madre inmune y padre susceptible. Quedaría entonces la interrogante del modo de transmisión entre los hermanos restantes, al no poderse evaluar desde el punto de vista serológico a sus progenitores. Por otra parte, si se tiene en cuenta que no se pudo precisar el momento en que éstos se infectaron (antes, durante o después del nacimiento) y que 5 de 14 conviventes infectados eran hijos de madres portadoras, no se puede desprestigiar la importancia de la vía vertical o perinatal como forma importante de transmisión de la enfermedad dentro de este estudio.

A pesar de que Cuba se encuentra dentro de las zonas de baja endemicidad y las transmisiones perinatal e intrafamiliar son características de áreas con prevalencias altas de infección, era de esperar este tipo de comportamiento; por la tendencia al agrupamiento familiar, por la elevada exposición y posible asociación genética. Otros países con similares índices de prevalencia han encontrado este tipo de tendencia y le han dado importancia a su contribución en la transmisión horizontal,

como es el caso de algunas regiones de Italia (*Albertoni F*).<sup>27</sup>

Si se tiene en cuenta que del total de conviventes infectados crónicos por el VHB uno sólo no se encontraba relacionado genéticamente con el caso índice, se tiene una sugestión de interés para apoyar aún más la asociación del factor genético; dado por el comportamiento de haplotipos HLA, y de la exposición del virus, donde pueden desempeñar un papel importante los factores inductores de tolerización a padecer formas crónicas de la enfermedad.

La distribución de la concentración de anti-AgsHB (tabla 4), espontánea e inducida por la vacunación, se comportó en ambos de forma muy similar a los estudios de pesquiasaje de tipo secundario en población abierta, donde se encontró una seroprotección de 40,33 % y una hiperrespuesta de 55,72 %.

Partiendo del hecho de que no se observaron diferencias porcentuales significativas al tener en cuenta la relación genética entre el portador y sus conviventes (tabla 5), que las medias geométricas de las concentraciones de anti-AgsHB no difirieron entre consanguíneos y no consanguíneos (tabla 6) y la no influencia de los diferentes grupos (respuesta en consanguíneos y no consanguíneos de forma natural e inducida por la vacunación) sobre la respuesta anti-AgsHB observada durante el análisis del ajuste estadístico del modelo lineal, podría hacer pensar que no existen entre el portador crónico y sus familiares consanguíneos, genes compartidos relacionados con el control de la respuesta anti-AgsHB y la tendencia a padecer formas crónicas de la infección; pues si se supone que existieran mecanismos dependientes de haplotipos similares al del infectado crónico, tendrían estos conviventes consanguíneos una respuesta anti-AgsHB inferior con respecto a la de los no consanguíneos.

Sin embargo, al correlacionar la concentración del AgsHB de los portadores con la respuesta anti-AgsHB inducida por la vacunación en convivientes consanguíneos y no consanguíneos, se encontró una fuerte asociación negativa entre los consanguíneos, y de tipo positiva en los no relacionados genéticamente (no consanguíneos); de forma tal que a elevadas concentraciones de antigenemia fueron superiores las cifras de anti-AgsHB, contrario a lo observado en los consanguíneos donde a altas concentraciones de antígeno del caso índice fueron inferiores los niveles de anticuerpos. Esto hace pensar que un factor importante a tener en cuenta para poder explicar la asociación inversa encontrada, sería la inducción de tolerancia en los convivientes por exposición al virus mediante vías poco inmunogénicas (no parenterales). No obstante, al considerar que las asociaciones fueron en su totalidad diferentes en los relacionados genéticamente y los que no lo son, pierde valor este planteamiento; y refuerza la idea de que hay algún tipo de relación entre las regiones genéticas que codifican para la respuesta a la infección y a la vacunación.

Es de suponer que los portadores incluidos dentro del rango de concentración de antígenos más altos, sean aquéllos cuya capacidad para desencadenar mecanismos citotóxicos y de neutralización viral sea menor, y por lo tanto, sus convivientes consanguíneos que presentan niveles de anticuerpos inferiores, compartan de algún modo mayor similitud en variantes de secuencias dentro de los segmentos genéticos relacionados con la respuesta para el aclaramiento del virus; así como para la elaboración de anticuerpos frente a la proteína de cubierta del virus.

Se ha demostrado una frecuencia incrementada de haplotipos asociados con la ausencia o baja respuesta frente a la vacu-

nación como son HLA B 8, SC 01, DR 3, B 44, BR 7, algunos de los cuales aparecen también (B 8) con frecuencia aumentada en los individuos que presentan formas crónicas de la infección.<sup>28,29</sup> Sin embargo, hasta el momento no existen estudios que muestren la repercusión serológica de esta asociación.

Los resultados obtenidos, donde se demuestra que la concentración de anticuerpos dirigidos contra la proteína de cubierta del VHB fue superior en los vacunados con respecto de los que desarrollaron una respuesta espontánea, podrían atribuirse al hecho de que la evaluación serológica en los inmunizados se realizó de forma controlada y durante el período en que la respuesta anti-AgsHB fue más intensa; no así en los individuos con respuesta natural, donde inevitablemente, no se pudo precisar el momento de la puesta en contacto con el virus y tal vez se evaluó cuando en la cinética de la respuesta inmunitaria los títulos de anticuerpos específicos ya habían declinado.

La interacción significativa entre sexo/grupo con respecto a la respuesta anti-AgsHB se pudo interpretar que la variable sexo sobre esta respuesta no fue igual dentro de los diferentes grupos, se confirmó por los resultados de la influencia del factor sexo sobre la respuesta anti-AgsHB. La mejor respuesta observada en las mujeres corrobora otros estudios, donde en el sexo femenino la respuesta inmune tras la vacunación es superior en calidad con respecto al masculino.<sup>30,31</sup>

A pesar de que existen evidencias concluyentes de la influencia de la edad sobre la respuesta anti-AgsHB no se pudo demostrar esta asociación, porque su distribución fue muy homogénea para los 4 grupos de estudio.

Se puede concluir que no se encontró asociación entre la infección y un factor de riesgo detectable. Se demostró asocia-

ción de tipo directa entre los niveles de ADN viral circulante en suero y del AgsHB, al igual que la concentración de éste y los niveles enzimáticos de ALAT.

Se observó un porcentaje significativo de infectados crónicos con cargas virales circulantes en suero y niveles normales de enzimas, y constituyó una fuente importante de diseminación; y que la diseminación de la infección es un riesgo potencial por el elevado número de convivientes sin evidencia de protección.

Se encontró una elevada prevalencia de infección con tendencia al agrupamiento familiar y la respuesta de anti-AgsHB no difirió entre los consanguíneos y no consanguíneos.

La fuerte asociación negativa entre la concentración del AgsHB del caso índice y los niveles de anti-AgsHB de sus convivientes consanguíneos, hizo inferir la existencia de genes compartidos relacionados con el control de la respuesta anti-AgsHB y con el aclaramiento del virus.

## SUMMARY

Chronic infection by HBV is a clear and important cause of morbidity and mortality worldwide. An important problem, for the control and eradication of this disease is the existence of chronic HBV carriers and their family contacts. A biochemical and immunological study of chronic HBV reservoirs were conducted to determine the relation between the concentrations of HBV surface antigen, detected and quantified by the ELISA method, and the serum viral DNA concentrations; as well as the correlation between the levels of antigenemia and the transaminase values (ALAT). A direct linking was proved between viral DNA and HbsAg levels and also between antigen concentration and ALAT values. A significant percent of carriers with high viral charges and normal enzymatic levels was observed. The performance of immune response to HBV in those persons living with the chronic HBV-infested subjects was analyzed and the frequency of occurrence of immune, sensitive and infected persons was estimated resulting in a high number of infected persons and persons living with the chronic patients without protection. Qualitative and quantitative ELISA were used to assess the response of antibodies to HbsAg, induced by vaccines or by normal contacts of blood related and non-related persons in the family, but there was no difference among them. The HbsAg concentration of the carrier was associated with levels of antibodies to HbsAg; after completion of the vaccination program in blood related and non-related subjects, then the association was found to be negative in the former and the existence of shared genes linked to the control of anti-HbsAg response and viral clearing were inferred.

*Subject headings:* HEPATITIS B VIRUS/immunology; HEPATITIS B, CHRONIC/immunology; HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN/immunology; DISEASE TRANSMISSION; DISEASE RESERVOIRS

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Judmainer G. Epidemiologie, Klinik und Prognose der Virus hepatitis B. Acta Med Austr 1998;37:21-35.
2. Epidemiología de la hepatitis B en las Américas. Washington DC: OPS, 1998:73-85. (Publicaciones científicas).
3. OPS. Hepatitis B y Delta. Bol Epidemiol 1995;5(3):10-1.
4. Wands JR, Vlum HE. Primary hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 1991;325:729-31.
5. Beasley RP, Lin C, Hwang LY. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. Lancet 1981;2:1129-33.
6. Gendon Y. Who strategy for the global elimination of the new cases of hepatitis B vaccine. WHO 1990;(8 Supl):129.
7. Yoffe B, Noonam CA. Hepatitis B virus: New and evolving issues. Dig Dis Sci 1992;37:1-9.
8. Gittin N. The serum glutamic oxalacetic transaminase/glutamic piruvic transaminase ratio as a pronostic Index in severe acute viral hepatitis. Am J Gastroenterol 1982;77:2-4.
9. Weir WRC, Meller JA. Significance of hepatic enzyme levels at discharge in acute viral hepatitis. J Infect 1991;3:309-15.
10. Alter M, Mast E. The epidemiology of viral hepatitis in the USA. Gastroenterol Clin North Am 1994;23:437.

11. WHO. Toward the elimination of hepatitis B in developing world. Global perspective on Hepatitis. Final Reports. 1994;5:1.
12. McMahon BJ, Wainwright RB. HBV infection and sequelae in Alaska native. En: Progress of hepatitis immunization. California: 1990;491.
13. Kane MA. Control of hepatitis B in the United States. Strategies for areas of lower endemicity. En: Progress of hepatitis immunization. California: 1990;401.
14. Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the USA. Gastroenterol Clin North Am 1994;23:437.
15. Tong MJ. The clinical consequence of perinatal infection of HBV. En: Progress in Hepatitis B Immunization. California: 1995;194:3.
16. Fattovich G, Consorzio per sviluppo della medicina tropicale-CMT. Natural history of cronic hepatitis B virus and hepatitis delta virus infection and disease. En: Infectious diseases and public health. Ed. Angelico M, Rocchi G. Roma: 1998;172-9.
17. Reitman S, Frankel S. Method for detection of transaminases levels. Am J Clin Pathol 1957;28:56.
18. González Griego A, Alerm A, Vèga I. Cuantificación del antígeno de superficie del VHB en muestras biológicas con fines asistenciales y preparativos. Biotecnol Aplic 1993;10:104.
19. Ganey D, Varnus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. Ann Rev Biochem 1987;56:51-693.
20. Ferrari C, Chisari FV, Fiaccadori F. The cellular immune response to hepatitis B virus infection. En: American Association of Liver Diseases. Viral hepatitis A to F and update. Chicago:1994;III-2.
21. Francis V. Hepatitis B immunopathology. Semin Immunopathol 1995;17:261-81.
22. Chisari F, Ferrari C. HVB. Immunopathogenesis. Annu Rev Immunol 1995;13:29-60.
23. ———. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. En: Viral pathogenesis. Ed. Nathenson N. New York: Raven, 1994.
24. Penna A, Del Prete G. Predominant T helper 1 cytokine profile of HBV nucleocapsid-specific T cells in acute self limited hepatitis B. J Hepatol 1996;25(4):1002-33.
25. Papaevangelou G, Roumeliotou A, Chatmizas M. Epidemiological characteristics of hepatitis B virus infection in Cyprus. Eur J Epidemiol 1988;4:150.
26. Di Nardo V, Petrosillo N, Ippolito G. Prevalence and incidence of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus among personnel and patients of a psychiatric hospital. Eur J Epidemiol 1995;11(2):239-43.
27. Albertoni F, Ippolito G, Perucci C. The Latin Hepatitis B Prevention Group. Hepatitis B control program in Italy. En: Coursaget P, Tong MJ eds. Progress in Hepatitis B immunization. California: 1990;194:429.
28. Kruskall MAS, Alper CA, Awdeh Z. The immune response to hepatitis B vaccine in human. Inheritance patterns in families. J Exp Med 1992;175:45.
29. Ferrari C, Penna A, Bertoletti A. Cellular immune response to hepatitis B encoded antigen in acute and chronic infection. J Immunol 1990;145:3334.
30. Juliao O, González A, Ramírez V. Estudio de inmunogenicidad para dos vacunas recombinantes contra la hepatitis B comparando dos esquemas. Biom Colombia 1991;11:71-3.
31. Juliao O, González A, Ramírez V, Rojas C, Iglesias A. Resultados al primer año de aplicada la vacuna recombinante cubana anti-HVB en esquemas 0-1-2 y 0-1-6 meses. Biom Colombia 1993;13.

Recibido: 29 de noviembre de 1999. Aprobado: 17 de diciembre de 1999.

Dr. *Jorge Arturo Santiesteban Torres*. Instituto Superior de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón". Avenida 146 No. 3102 esquina a 31, reparto Cubanacán, municipio Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 11600.