

## Reunión conjunta con unidades centinela de hepatitis - (Parte II)

Coordinador: Dr Alberto Muñoz  
Secretaria: Dra Silvia Mengarelli

<b>Aplicación de la Biología Molecular en los Pacientes con Hepatitis B</b> Dr José Luis Fernández	Página 44
<b>La Inmunización Universal de Niños contra la Hepatitis A lleva a la Desaparición de la Enfermedad en Israel</b> Dr Daniel Shouval (Israel)	Página 46
<b>Hepatitis E en la Argentina</b> Dra M. Silvina Munné	Página 47
<b>Vacuna PreS/S para Inducir la Seroconversión Rápida y Evitar la Resistencia en No-Respondedores a las Vacunas Convencionales contra la Hepatitis B</b> Dr Daniel Shouval (Israel)	Página 48

### Aplicación de la Biología Molecular en los Pacientes con Hepatitis B

José Luis Fernández.

*Unidad de Investigación Clínica, Universidad Austral*

En los últimos años, la biología molecular ha permitido realizar avances importantes en el conocimiento de la estructura y replicación del virus de la hepatitis B (HBV). La detección del ADN del HBV (HBV DNA) en el suero y su cuantificación mediante técnicas cada vez más sensibles se han convertido en determinaciones imprescindibles para el tratamiento de la hepatitis crónica B. Sin embargo, no todos estos avances tienen una utilidad clínica demostrada y esta presentación, además de describirlos, busca determinar cuál es su aplicación práctica.

#### Genoma del HBV

El HBV es un virus ADN de 42 nm de diámetro. Tiene una nucleocápside que contiene el HBV DNA y una envoltura con doble capa lipídica en la que se insertan las proteínas de superficie.<sup>1</sup> La organización del genoma del HBV es sumamente compleja: 1) El HBV DNA, constituido por dos cadenas desiguales (negativa y positiva) que totalizan 3.2 kilobases y conforman una estructura circular, tiene cuatro marcos de lectura abiertos para codificar siete proteínas. El gen P (polymerase) es el mayor, cubre el 80% del genoma y codifica la polimerasa. El gen C (core) codifica los antígenos HBc (HBcAg) y HBe (HBeAg) de la nucleocápside. El gen S (surface) codifica las tres proteínas de envoltura. El gen X codifica el antígeno HBx, una pequeña proteína necesaria para la infec-

tividad in vivo y para la transactivación de genes celulares y virales. Además de estos genes, el genoma viral contiene un promotor que permite la unión de factores de transcripción del huésped y la iniciación de la síntesis de ARN mensajero. 2) La polimerasa tiene varias actividades: transcriptasa reversa, ARNasaH y ADN polimerasa. 3) La cápside viral está formada por el HBcAg. La proteína precore/core contiene un péptido de señal que permite la inserción de la proteína HBe en la membrana del retículo endoplásmico de la célula huésped, orientando la proteína precore/core a la vía secretora del huésped. Una vez producido este paso, el extremo terminal de la secuencia es clivado y se libera el péptido residual HBe que circula por la sangre como un antígeno soluble (HBeAg), indicando que la replicación viral está activa. 4) El HBsAg es la principal proteína de envoltura. Junto con dos proteínas más largas, la mediana (M) y la larga (L), está inserto en la cobertura lipídica que rodea la cápside viral.<sup>1,2</sup>

Cuando una partícula de HBV infecta una célula hepática la capa lipídica del virus se fusiona con la membrana del hepatocito, liberando la nucleocápside en el citoplasma. El ácido nucleico migra al núcleo de la célula huésped. Allí es transformado en una molécula circular de ADN proviral (cccDNA). El cccDNA no se incorpora al genoma del huésped y no afecta la viabilidad de la célula. En el primer paso de la replicación, la RNA polimerasa del huésped transcribe el cccDNA a ARN mensajero pregenómico. El ARN mensajero deja el núcleo y es traducido en el citoplasma, por los ribosomas del huésped, a poli-

merasa viral y proteínas del core. Luego, estas proteínas y el ARN mensajero son encapsidados. Dentro de la cápside se sintetiza la cadena de ADN negativa, mediante la acción de la transcriptasa reversa y usando el ARN como templado. Una vez sintetizado el ADN, el ARN es degradado por el dominio RNaseH de la polimerasa. La cadena de ADN positiva es sintetizada por la polimerasa, usando el ADN negativo como templado.<sup>2,3</sup>

### Variantes del genoma del HBV

Genotipos. El HBV tiene variaciones genéticas intrínsecas y se han identificado ocho genotipos mayores (A a H). La genotipificación puede hacerse por secuenciación directa, enzimoimmunoensayo, RFLP o LiPA, prefiriéndose en la práctica los dos últimos métodos. Desde el punto de vista epidemiológico, el genotipo A predomina en el norte de Europa, Norteamérica y sur de África. El genotipo D es prevalente en la cuenca del Mediterráneo, la India y algunas zonas de Norteamérica. Los genotipos B y C son más frecuentes en el este de Asia y los genotipos F y H en Sudamérica. El genotipo G fue identificado en Francia, Alemania, México y Estados Unidos. En cuanto a la repercusión clínica, se observó en varios estudios asiáticos que la seroconversión del HBeAg, la progresión histológica y el hepatocarcinoma son menos frecuentes en el genotipo B que en el C. En unos pocos estudios occidentales se vio que la remisión sostenida, la enfermedad más leve y la eliminación del HBsAg son más frecuentes en el genotipo A que en el D. Por el contrario, el riesgo de hepatocarcinoma sería mayor en el genotipo A. El genotipo D ha sido vinculado a la hepatitis fulminante. Con respecto al tratamiento, comparando el genotipo B con el C y el A con el D, la respuesta al interferón y al lamivudine fue menor en los genotipos C y D. Los genotipos no parecen condicionar la respuesta al adefovir. A pesar del fuerte impacto de los genotipos del HBV, las evidencias actuales no sostienen la incorporación de la genotipificación a la práctica clínica. Es probable que en el futuro ésta se convierta en un factor relevante para la toma de decisiones terapéuticas.<sup>4,5</sup>

Mutantes del HBsAg. Tienen influencia en el escape a la vacuna o a la inmunoprofilaxis con gammaglobulina hiperinmune. Pueden además causar una infección oculta porque no la detecta el kit estándar para HBsAg.<sup>1</sup>

Mutantes del promotor core o del precore. La característica principal de esta mutante es la falta de expresión del HBeAg con conservación de la replicación viral. Se produce de esta manera lo que conocemos como hepatitis crónica HBeAg negativa. En la práctica, no se realiza la secuenciación sistemática y el diagnóstico es esencialmente clínico: HBeAg negativo, anti-HBe positivo, HBV DNA en altos títulos, aminotransferasas elevadas y hepatitis activa con progresión histológica.<sup>6</sup>

Mutantes de la polimerasa. Las mutantes de la polime-

rasa son seleccionadas como una forma de escape a la presión de los análogos de nucleósidos, condicionando la resistencia a estas drogas. La más conocida es la de la región YMDD, secundaria a la administración de lamivudine, pero existen varias mutaciones provocadas por el propio lamivudine o los otros análogos. Tampoco se realiza en este caso la secuenciación rutinaria y el diagnóstico de resistencia se hace, después de una respuesta inicial, por el ascenso progresivo de los títulos de HBV DNA y la elevación de las aminotransferasas.<sup>7</sup>

### Detección del HBV DNA

La cantidad de HBV DNA que circula en el suero es una medida del grado de replicación viral y se correlaciona con la progresión de la hepatopatía. Tanto la hepatitis crónica HBeAg positiva (wild type) como la HBeAg negativa (mutante del precore) cursan con niveles altos de viremia. ¿Cuál es el punto de corte por encima del cual los niveles de viremia tienen repercusión clínica? Inicialmente, basándose en el límite de detección de los ensayos de hibridización no amplificados y en que la carga viral descende por debajo de ese límite en los pacientes con seroconversión del HBeAg, se estableció un umbral de 105 copias/ml. Varios consensos internacionales recomendaron iniciar el tratamiento cuando la carga viral supera dicho umbral.<sup>8</sup> Luego, el desarrollo de ensayos más sensibles, basados en distintas técnicas de amplificación y capaces de detectar niveles muy bajos de HBV DNA (hasta 200 copias/ml), mejoraron considerablemente la comprensión de la patogenia e historia natural de la infección por HBV. Se supo que los niveles de HBV DNA permanecen detectables en la mayoría de los pacientes con respuesta al tratamiento pero que no todos los pacientes con niveles menores de 105 copias/ml están exentos de tener daño hepático, sobre todo si son HBeAg negativos o tienen cirrosis. Recientemente, en base a estas observaciones, un panel de hepatólogos estadounidenses recomendó indicar el tratamiento por encima de los siguientes niveles: 105 copias/ml en los pacientes HBeAg positivos, 104 copias/ml en los HBeAg negativos o cirróticos compensados y 103 copias/ml en los cirróticos descompensados.<sup>9</sup> Sin embargo, se desconoce el nivel preciso por encima del cual hay enfermedad progresiva. También son dispares los criterios de respuesta virológica al tratamiento usados en los diferentes ensayos clínicos. ¿Qué umbral puede adoptarse en la práctica clínica hasta tanto se aclare esta cuestión y se estandaricen los criterios? Por ahora se considera que el umbral de 105 copias/ml no ha perdido completamente su vigencia, que la decisión debe adecuarse a cada paciente y que el nivel de HBV DNA debe evaluarse en combinación con otros parámetros, especialmente el HBeAg, las aminotransferasas y el daño histológico.<sup>10</sup>

## Referencias

1. Zoulim F. Virology of hepatitis B. Elsevier, Paris; 2004: 25-41.
2. Lee WM. Hepatitis B virus infection. N Engl J Med 1997;337:1733-1745.
3. Lai CL, Yuen MF. Profound suppression of hepatitis B virus replication with lamivudine. J Med Virol 2000;61:367-273.
4. Chu CJ, Lok AS. Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. Hepatology 2002;35:1274-1276.
5. Schaefer S. Hepatitis B virus: significance of genotypes. J Viral Hepat 2005;12:111-124.
6. Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. Hepatology 2003;38:1075-1086.
7. Locarnini S, Hatzakis A, Heathcote J, Keeffe EB, Liang TJ, Mutimer D, Pawlotsky J-M, Zoulim F. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. Antiviral Ther 2004;9:679-693.
8. The EASL Jury. EASL. International Consensus Conference on Hepatitis B. J Hepatol 2003;38:533-540.
9. Keeffe EB, Dieterich DT, Han S-H B, Jacobson IM, Martin P, Schiff ER, Tobias H, Wright TL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. Clin Gastroenterol Hepatol 2004;2:87-106.
10. Zeuzem S. Molecular methods of diagnosis of HBV infection. En: Buti M, Esteban R, eds. VII International Symposium on Viral Hepatitis. Acción Médica, Madrid, 2003; 13-17.

## Universal immunization against hepatitis A to toddlers in Israel is leading to disappearance of HAV infection - The Jerusalem experience

Daniel Shouval

*Liver Unit, Hadassah-Hebrew University Hospital, Jerusalem, Israel*

**Background:** Until recently, Israel was a country in transition with an intermediate endemicity for hepatitis A (HAV), manifested by an average annual rate of 39.5/100.000 in the years 1995-8. The average annual incidence for the Jewish majority and Arab minority population was 37.2 and 57.8/100.000 respectively for all age groups. In a collaborative pre-vaccination pilot study with the Ministry of Health in Israel, the Centers for Disease Control in Atlanta and the University of Michigan, USA, conducted in 1997-8, peak incidence of HAV infection occurred between age 4-9 in the Jerusalem district.

**Intervention:** In July 1999 an inactivated HAV vaccine (HAVRIXR, GSK, Belgium) was added to the regular Expanded Program of Immunization and offered free of charge at a two dose regimen (720 EU/dose) to all babies in Israel at 18-24 months of age. (Time of first injection was selected to minimize interference of maternal anti-HAV antibodies with immunogenicity of the vaccine). The initiative started with toddlers born in January

1998 without a catch-up program to any other age group. A passive surveillance system was already in place for the entire country for several decades, while an active surveillance program was started in the Jerusalem region in 1998. Contact was established with all primary care physicians and pediatricians in Jerusalem through the health insurance system (HMOs) which covers almost 100% of the population. All reported acute (clinical) HAV cases were confirmed through an anti-HAV IgM EIA followed by telephone interviews for monitoring the index case and any newly infected household member. Vaccine coverage for the first dose was approximately 90%. Only <10% of individuals outside the target population were sporadically immunized through private initiatives.

**Results:** Within 3 years from initiation of the program, the annual incidence of clinical hepatitis A in Israel in general and in the Jerusalem district in particular dropped sharply in the entire population, irrespective of the age group, to < 5/100.000 as of July 2002. This low incidence has been stable as per July 2004/

**Conclusions:** Israel is the first country worldwide to introduce universal immunization against hepatitis A, administered exclusively to all toddlers. Immunization lead to an abrupt reduction in the incidence of clinical hepatitis A in the entire population, babies, children and adults within less than 3 years of initiation of the program.

## Hepatitis E en Argentina

María Silvina Munné

El virus de Hepatitis E (HEV) es uno de los cinco virus hepatotropos. Al igual que el virus de Hepatitis A (HAV) es de transmisión entérica y causante de hepatitis aguda.

Es un virus RNA desnudo de polaridad positiva. Las partículas virales miden 32-34nm y fueron visualizadas por primera vez en el año 1983. Su genoma se caracterizó en 1990.

A través de agua contaminada se ha vinculado a grandes brotes y epidemias de hasta cientos de miles de personas en el centro y sur de Asia, norte y oeste de África. Estas cepas estaban genéticamente relacionadas a la cepa prototipo llamada Burma y corresponden al genotipo I. En América sólo se describió un brote en México y la caracterización genómica correspondió a un genotipo II.

La sintomatología de la hepatitis aguda causada por este virus es indistinguible clínicamente de las causadas por otros virus. Sin embargo la característica más relevante es que produce falla hepática fulminante hasta en un 25% en embarazadas de países de alta endemicidad, por causas aún no determinadas.

Desde su descubrimiento se demostró la prevalencia de anticuerpos antiHEV en diversos animales.

En países de baja endemicidad de Europa y Estados Unidos se observó una prevalencia antiHEV en donantes de bancos de sangre del 1 al 5% y un 8 a 10% en hepatitis agudas no A-C en pacientes sin antecedentes de viajes a zonas endémicas. Esto generó diversas hipótesis que comenzaron a resolverse en parte cuando en 1997 se aisló la primera secuencia de HEV en cerdos de Estados Unidos y dos secuencias autóctonas relacionadas a la primera en pacientes con hepatitis aguda.

A partir de entonces se han reportado nuevas cepas en humanos y en cerdos en distintos países (Estados Unidos, Italia, Grecia, España, Austria, Francia, Taiwán, Inglaterra, Japón y otros) antes considerados no endémicos, estrechamente relacionadas. Estas cepas agrupan en los genotipos III y IV. La transmisión zoonótica para este virus parecería la vía más probable de transmisión en países no endémicos. En Japón se han detectado casos vinculados a la ingestión de carne de jabalí y de ciervo o hígado de jabalí y de cerdo.

Los genotipos III y IV serían menos patogénicos que el I y II. Sin embargo en Japón se han descrito fallas hepáticas fulminantes en adultos por genotipo III y IV.

¿Qué datos tenemos en Argentina?

En cuanto a prevalencia de antiHEV:

- En donantes de sangre fue del 1.81%, en pacientes pre-quirúrgicos 3.11% y en niños 0.15% (Rey J y col 1996).

- En niños en riesgo social fue del 2% (González J y col 1994).

- En pacientes HIV 6.6% (siendo del 0% en el grupo del H. Fernández, 3.5% en H. Muñiz y 12% en el H. Posadas) (Fainboin H y col 1999).

- En pacientes adultos y pediátricos con hepatitis aguda esporádica NoA-C con o sin falla hepática la prevalencia global fue del 10.6% (González J y col 1994).

- En Corrientes se reportó un 77.5% en pacientes con hepatitis aguda de etiología no determinada (Vilar J y col 1996).

En cuanto a la caracterización genómica se describieron dos nuevas variantes correspondientes al genotipo III en dos pacientes adultos que cursaban hepatitis aguda estudiados en el hospital Argerich. (Schlauder y col 2000)

En el Laboratorio Nacional de Referencia para Hepatitis virales del INEI-ANLIS “Carlos G. Malbrán” determinamos la prevalencia de antiHEV en cerdos de distintas localidades de Argentina. En todas las localidades hubo cerdos con antiHEV positivo, siendo la prevalencia global 22.7% y la mayor del 58% en Carmen de Patagones Prov de Bs As. 96% de un grupo de cerdos de 1 mes estudiados en un criadero de la zona de Pergamino tenían HEV RNA detectable en materia fecal y la cepa caracterizada correspondía al genotipo III y presentaba la mayor homología con las variantes humanas de Argentina.

En este congreso hemos comunicado tres casos de fallas hepáticas fulminantes en niños atendidos en el H. Garrahan con HEV RNA detectable, correspondientes también al genotipo III y con elevada similitud a las variantes antes mencionadas.

El verdadero impacto de esta patología no se conoce en el país.

En los datos comunicados al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SiNaVe), recién en 1996 se realiza la diferenciación entre hepatitis A, B, C, otras y sin especificar. Un grupo de provincias sólo notifican “sin especificar”. Siendo nuestro país endémico para virus A se asume generalmente que las hepatitis agudas autolimitadas corresponderían a este virus.

Por los reportes recibidos cada año como Laboratorio Nacional de Referencia de 24 unidades centinela ubicadas en 13 provincias, tenemos conocimiento que no se estudia al HEV como agente etiológico de hepatitis aguda.

En series de transplantes en niños y adultos no se informa al virus E como agente etiológico estudiado.

En la falta de diagnóstico diferencial para la infección por HEV en nuestro país podemos reconocer diversas causas, entre las cuales quizás la más importante sea la pobre respuesta que se puede dar desde el laboratorio, por varias razones. Los equipos diagnósticos han utilizado como Ag de captura cepas de genotipos de zonas endémicas que no son los de áreas no endémicas. Sumado a esto la respuesta inmune que genera esta infección es particular (falta o pérdida de anticuerpos detectables) o al

menos no es posible determinarla con las actuales herramientas. El uso de marcadores directos como Ag o RNA contribuiría solo parcialmente, dado que su ausencia podría deberse a su corta duración o a su labilidad en condiciones fisicoquímicas externas. Pese a todo esto consi-

deramos que su diagnóstico, aunque difícil, debería ser siempre tenido en cuenta ya que si bien sabemos que circula en el país rara vez es estudiado. La determinación oportuna y la calidad de la muestra aumentan las posibilidades de lograrlo.

### **A Pre-S/S Hepatitis B Vaccine for Rapid Induction of seroconversion and Bypass of Resistance in Non-responders to Conventional Vaccines**

Daniel Shouval

*Liver Unit, Hadassah-Hebrew University Hospital, Jerusalem, Israel*

Bio-Hep B/Sci-B Vac/Hepimmune is a mammalian cell derived hepatitis B vaccine expressing the three hepatitis B Virus (HBV) envelope proteins namely the small S, the middle Pre-S2 and the large Pre-S1 antigens formulated in alum. In 17 clinical trials conducted in 3025 adults, children and neonates, The vaccine has been shown to be highly immunogenic with an excellent tolerability and safety record. Seroprotection rates in vacci-

nees receiving three vaccine doses at 0,1 and 6 months or two doses at 0 and 6 months were significantly higher in recipients of the Pre-S/S vaccine as compared to control derived S vaccine. The enhanced immunogenicity of the mammalian cell derived vaccine as compared to two control, yeast derived vaccines, was manifested in faster seroprotection rates and higher anti-HBs titers in recipients. Furthermore, results of a controlled study in a population of non-responders and low responders to conventional vaccines suggest an enhanced immunogenicity of Bio-Hep B in the non-responders (>30%enhancement) as well as in obese individuals. In conclusion: Bio-Hep B/Sci-B Vac is a new immunogenic hepatitis B vaccine containing Pre-S1, Pre-S2 and S antigens which contribute to an enhanced immunogenicity in all age groups and in non-responders.