



**MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”**



INFECCION OCULTA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN HIJOS DE MADRES POSITIVAS AL HBsAg

Autora: Lic. Delmira Rodríguez Argueta

Tutores: Dra. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, DrC.

Lic. Marité Bello Corredor, MsC.

Asesores: Dra. María Caridad Montalvo Villalba, DrC.

Dr. Plácido Pedroso Flaquet, DrC.

Lic. Susel Sariego Frómeta, MsC.

Tesis para optar por el título de Máster en Virología

La Habana, 2014

DEDICATORIA

A mi amada hija Elizabeth Samantha, también a mí amada madre.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente **agradecer** infinitamente a “Dios” por la dicha que me ha concedido de poder haber ejercido mi estudio de Máster en Cuba.

Como primeras personas agradezco a mi familia por su apoyo incondicional, en principal a mi madre Juana Francisca, gracias por cada consejo, por ayudarme en mi formación profesional y personal día a día y por darme su amor infinito a pesar de la distancia, a mis hermanos Gilberto, Miguel, Adonis, a Wendy mi cuñada por su grande apoyo.

Dar las infinitas gracias a mis tutoras: A la Dra. Licel Rodríguez, que a pesar de mis muchos momentos de dificultades estuvo en la mayor disposición de ayudarme, por sus consejos, por ser tan excelente guía, por brindarse, por sus valiosas enseñanzas, por permitirme ser parte del laboratorio de las hepatitis, por todo le estoy eternamente agradecida.

A la Lic. Marité Bello, por su inmenso apoyo que siempre fue incondicional, por sus consejos, por la ardua tarea de recopilar los datos, por su colaboración en la realización del texto, gracias por ser tan excelente tutora, amiga, profesora. Promotoras de este trabajo que gracias a ellas y a su confianza que pusieron en mí para realizarlo, sin ellas no sería posible.

Agradezco muchísimo a mis Asesores: La Dra. Caridad Montalvo, Dr. Placido Pedroso, Lic. Susel Sariego, que conté siempre con su apoyo y sus consejos para lograr culminar.

Agradezco a las Técnico Meilín y Babi, por brindarse en la ayudarme en la parte de mi práctica.

Agradezco a cada una de las docentes, en todo el ámbito de la maestría de virología, que aportaron a mi formación como profesional, una guía, como también obtener logros con su grato apoyo profesional e incondicional.

A la Dra. Guadalupe Guzmán por su confianza puesta en mí y por darme sus consejos y apoyo **gracias**.

A los que están involucrados directa e indirectamente con el desarrollo de esta tesis gracias. A mis amistades que a la distancia siempre me han brindado sus consejos de éxitos y los que no mencione por nombres, pero si estuvieron presentes de alguna manera me aportaron su ayuda, **Gracias** a todo el que de una manera u otra me ha ayudado a la realización de la Tesis.

RESUMEN

La infección oculta por el virus de la Hepatitis B (IOB), se caracteriza por la presencia en suero o plasma del genoma viral (ADN-VHB) y anticuerpos contra la proteína de la cápside (anti-HBc) en ausencia del antígeno de superficie (HBsAg), marcador que tradicionalmente se emplea para identificar la presencia del virus. Con el objetivo de caracterizar la presencia de IOB en hijos de madres positivas al HBsAg, se estudiaron 291 muestras séricas de niños que cumplían la condición de ser HBsAg (-) y anti-HBs menor de 50UI/L, conservadas en la seroteca del Laboratorio de Referencia Nacional de Hepatitis Virales. Se realizaron ensayos para determinar la exposición al virus (anti-HBc), los sueros con anti-HBc (+) se les realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (RCP-TR) para determinar y cuantificar el ADN-VHB. La prevalencia de exposición al VHB (anti-HBc) en la población estudiada fue 16,8% (49/291). Solo pudieron ser analizadas 43. El ADN viral se cuantificó en el 14% (6/43) de los casos, observándose cargas virales que oscilaban entre $2,15 \times 10^1$ hasta $3,42 \times 10^1$ UI/mL. La prevalencia de la IOB para el total de los pacientes analizados fue 2,1% (6/291). No se encontró asociación significativa entre las variables sociodemográficas analizadas tales como, edad, sexo y provincia de procedencia. La prevalencia de IOB es relativamente baja, las implicaciones clínicas y epidemiológicas de esta entidad, requiere de un estrecho monitoreo y atención de estos pacientes. Este estudio se realiza por primera vez en Cuba y aporta conocimientos útiles para el diagnóstico, prevención y control de esta enfermedad en niños.

INDICE

I.-Introducción	1
II.-Objetivos	
2.1.-Objetivo General.....	3
2.2.-Objetivos Específicos.....	3
III.-Revisión Bibliográfica	
3.1.-Antecedentes Históricos.....	4
3.2.-Características Estructurales.....	5
3.2.1-Estructura y Organización del Genoma.....	7
3.3.-Ciclo de replicación del VHB.....	7
3.4.-Variantes moleculares.....	9
3.4.1.-Genotipos virales.....	9
3.5.-Patogenia y Manifestaciones clínicas.....	10
3.6.-Diagnostico virológico	11
3.7.-Tratamiento.....	12
3.8.-Epidemiología.....	13
3.9.-Prevención y Control.....	15
3.10.-Infección Oculta por el Virus de la Hepatitis B. Algunos aspectos generales.....	16
3.10.1.-Infección Oculta por el Virus de la Hepatitis B en hijos de madres positivas al HBsAg.....	18
IV.-Materiales y Métodos	
4.1.-Universo de Estudio	22
4.2.-Muestra.....	22
4.2.1-Criterios de Inclusión.....	25
4.2.2.-Criterios de Exclusión.....	25
4.3.-Técnicas serológicas.....	25
4.3.1.-UltramicoELISA para detectar anti-HBc total (UMELISA anti- HBc).....	25
4.4.-Técnicas Moleculares.....	27
4.4.1.-Extracción del ADN-VHB.....	27
4.4.2.-Reacción en Cadena de La Polimerasa en Tiempo Real (RCP-TR).....	27
4.4.3.-Definiciones útiles en la investigación.....	29
4.5.-Consideraciones Éticas.....	29

4.6.-Análisis Estadísticos.....	30
V.-Resultados y Discusión	
5.1.-Prevalencia de exposición al VHB en hijos de madres positivas al HBsAg, según sexo y lugar de procedencia 2007-2012.....	31
5.2.-Distribución de los anti-HBc (+) según los títulos de anti-HBs 2007-2012.....	37
5.3.-Detección del Genoma del VHB en hijos de madres positivas al HBsAg en las muestras anti-HBc (+)/anti-HBs<50UI/L.....	39
5.4.-Relación entre la presencia de IOB con algunas variables sociodemográficas...	47
VI.-Conclusiones.....	52
VII.-Recomendaciones.....	53
VIII.-Bibliografía.....	54-63
Anexos	

I.- INTRODUCCION

El virus de la Hepatitis B (VHB) es uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, es una enfermedad transmisible aguda, que puede evolucionar a la cronicidad y ocupa el 9no lugar a nivel mundial, entre las diez primeras causas de muerte (Lee *et al.*, 2008).

En el organismo, la presencia del VHB provoca afecciones considerables, tanto así, que es considerado después del tabaco el agente más carcinógeno conocido. Inicialmente se manifiesta como un cuadro agudo, evolucionando luego de forma variable hacia la cronicidad entre un 5 y el 10% de los adultos, y en el 90% de los neonatos (Ciri3n *et al.*, 2010). Entre un 25 y 33% de los casos, transitan hacia la cirrosis hepática (CH) o carcinoma hepatocelular (CHC) (Alfonso *et al.*, 2003).

A nivel mundial, se estima que la Hepatitis B causa entre 500 000 a 1,2 millones de muertes cada a3o, y que la prevalencia de la infecci3n varía de forma importante en diferentes partes del mundo, (Wasley *et al.*, 2008). Se conoce que de 2 billones de personas infectadas, aproximadamente 300 a 350 000 evolucionan hacia las formas cr3nicas de la enfermedad (Ciri3n *et al.*, 2010).

Respecto a la transmisibilidad del VHB, se reconocen cuatro vías de transmisi3n: la parenteral, considerada como la más importante; la sexual; la perinatal o vertical (de madre a hijo) y la horizontal (contacto prolongado con personas infectadas) (Lavanchy, 2005; Shepard, 2006; de la Hoz, 2008; Beltrán, 2009; Ramia *et al.*, 2008; Paat *et al.*, 2009; Ciri3n *et al.*, 2010). La transmisi3n vertical es la forma más frecuente en los pacientes en edad pediátrica. Sin la profilaxis, aproximadamente entre el 65-90% de los nacidos de madres positivas al HBsAg y al antígeno e del VHB (HBeAg) podrían convertirse en portadores cr3nicos (Alper *et al.*, 1989).

El diagnóstico de la Hepatitis B tradicionalmente se ha realizado a través de técnicas serológicas diseñadas para detectar diferentes marcadores virales, entre los que se encuentran el HBsAg, como

principal marcador de infección y los anticuerpos totales contra el antígeno del núcleo (anti-HBc), que indican una infección pasada o crónica. Desde hace algunos años se incorporaron las técnicas moleculares para la detección del ácido desoxirribonucleico viral (ADN) y confirmar la replicación del VHB. Sin embargo, existe un grupo de personas donde solo se detecta el ADN-VHB y anti-HBc, en ausencia del HBsAg, que son las formas ocultas de infección producidas por el VHB (IOB) (Gutiérrez *et al.*, 2001; Torbenson y Thomas, 2002; Gerlich *et al.*, 2010; Thedja *et al.*, 2010). La IOB se diagnostica frecuentemente en pacientes que tienen como único marcador serológico al anti-HBc y en aquellos que presentan una baja o nula inmunidad contra el VHB (Aghakhani *et al.*, 2010; Ramezani *et al.*, 2010). La IOB es considerada actualmente como una infección emergente ya que en ciertas comunidades de elevada prevalencia, puede dificultar la seguridad de las transfusiones sanguíneas (Panigrahi *et al.*, 2010).

En Cuba se han realizado estudios de IOB en seropositivos al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y en pacientes hemodializados (Valdivia, 2011; Bello *et al.*, 2012). Los hijos de madres HBsAg (+) tienen el riesgo de infectarse con el VHB y en algunos países se realizaron estudios investigando la presencia de IOB en este grupo de riesgo.

El propósito del presente estudio fue determinar, el comportamiento que tiene la IOB, en hijos de madres positivas al HBsAg, grupo con elevado riesgo de exposición al VHB.

II.-OBJETIVOS

2.1.-Objetivo General:

- Caracterizar la presencia de infección oculta por el VHB en hijos de madres positivas al HBsAg.

2.2.-Objetivos Específicos:

- Determinar la exposición al VHB en hijos de madres positivas al HBsAg.
- Identificar la presencia de infección oculta en las muestras anti-HBc positivas.
- Determinar si existe relación entre la presencia de infección oculta con algunas variables sociodemográficas.

III.-REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1.- Antecedentes Históricos.

La hepatitis viral aguda (HVA) refiere a la enfermedad infecciosa del hígado, la cual es causada por varios virus, y se caracteriza por la necrosis aguda de los hepatocitos y por inflamación (Cirión *et al.*, 2010). La hepatitis es una enfermedad, cuyo conocimiento data de siglos pasados, pero el saber de los médicos de que dicha entidad era causada por un virus, no fue alcanzado hasta poco después de la Segunda Guerra Mundial. Exactamente en 1947, MacCallum logra diferenciar lo que hoy se conoce como la Hepatitis A de la Hepatitis B, gracias a los ensayos experimentales realizados con grupos de voluntarios, y así pudo identificar que mientras un tipo de hepatitis se propagaba a través de alimentos y aguas contaminadas (Hepatitis A) otra lo hacía a través de la sangre (Hepatitis B) (MacCallum, 1947).

Al comienzo de los años 70, los estudios experimentales de Murray (1955) y Krugman (1967), definieron la relación seroepidemiológica entre los diferentes tipos de hepatitis, aspecto éste que más adelante sirvió de base para la evaluación de nuevos métodos de diagnóstico e inmunoprofilaxis de estas enfermedades (Murray, 1955; Krugman *et al.*, 1967).

Blumberg, buscando polimorfismos séricos de la proteína ligada a la enfermedad, identificó un antígeno de Australia (Au) en el suero de pacientes con leucemia, lepra, y hepatitis; mientras que Prince y colaboradores, por su parte, encontraron otro antígeno (al que llamaron SH) en la sangre de pacientes transfundidos durante un período de incubación de la enfermedad, lo que les permitió establecer que ambos antígenos Au y SH eran idénticos (Ganem y Prince, 2004).

De esta manera Ganem y Prince, refieren que la hepatitis se encuentra representada por el HBsAg y aseguran que todos los estudios antes mostrados, hicieron posible el diagnóstico serológico de la Hepatitis B, abriendo una puerta a la investigación virológica y epidemiológica (Ganem y Prince,

2004). El descubrimiento y la caracterización del HBsAg fue un hecho relevante en la investigación científica sobre la Hepatitis B, permitiendo así un intenso estudio de la enfermedad y la naturaleza de su agente infeccioso. En 1970, Dane y colaboradores detectaron el virión completo de la Hepatitis B, mientras que subsecuentemente Magnius y Espmark en 1972, identificaron el HBeAg (Dane *et al.*, 1970; Magnius y Espmark, 1972).

El virus de la Hepatitis B es el prototipo de la familia Hepadnaviridae (virus ADN hepatotrópicos), que afecta al hombre y a primates no humanos. Pertenece al género Orthohepadnavirus, donde se encuentra el VHB que infecta a otros mamíferos. Todos estos virus comparten cierta similitud en cuanto a: estructura y organización del genoma, producen exceso de partículas subvirales lipoproteicas, estrecho rango de hospederos, y provocan infecciones persistentes con un marcado aunque no absoluto, hepatotropismo (Hollinger, 2010).

El VHB constituye una causa frecuente de enfermedades hepáticas agudas y crónicas y es capaz de desarrollar, a través de su integración en el genoma del hepatocito, un hepatocarcinoma. Aproximadamente el 5% de la población mundial está infectado por este virus; de éstos, entre el 50 y el 70% tienen replicación viral activa y están en riesgo de sufrir enfermedad hepática progresiva (Lavanchy, 2005).

3.2- Características estructurales.

Al examinar por microscopía electrónica el suero de personas infectadas por el VHB, se pueden detectar tres tipos de partículas envueltas. Las partículas Dane, de 42-47 nanómetros (nm) de diámetro y de doble membrana; las partículas esféricas de 20-22 nm; y las partículas filamentosas de 20-22 nm y longitud variable (Ganem y Prince, 2004). Los tres tipos de partículas presentan en común la presencia de una proteína en su superficie, denominada proteína S o HBsAg (Lavanchy, 2005; Gerlich *et al.*, 2010) (Figura 1).

Las partículas Dane constituyen los viriones completos e infecciosos del VHB. Las partículas esféricas y filamentosas están compuestas por lípidos derivados de la célula hospedera y carecen de ADN viral por lo que no son infecciosas. Sin embargo, en su forma pura, son altamente inmunogénicas e inducen eficientemente respuesta inmunológica neutralizante de anticuerpos contra el HBsAg (Gerlich *et al.*, 2010).

La envoltura más externa es de naturaleza lipoproteica pues a su componente proteico principal se asocian lípidos derivados de las células hospederas. La cubierta interna o cápsida nuclear de 27nm, tiene como componente principal a la proteína C, una fosfoproteína básica denominada antígeno core de la HB (HBcAg), (*del inglés Hepatitis B core Antigen*) con actividad quinasa. En la cápside se encuentra empaquetado el genoma y la ADN polimerasa viral (Lavanchy, 2005).

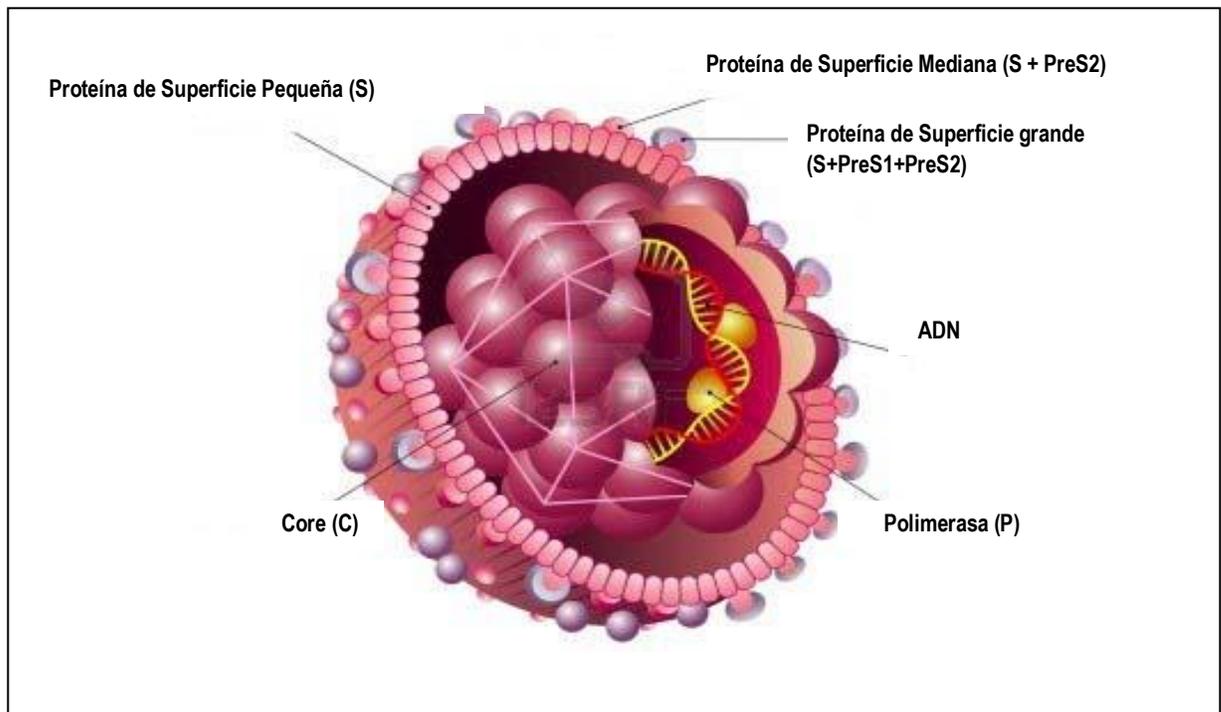


Figura 1. Estructura compleja del VHB (partícula Dane).

Fuente: Disponible en:http://es.123rfm.com/photo/_145577741_virus-de-la-hepatitis-b.html

3.2.1-Estructura y organización del genoma.

El VHB es probablemente el virus más pequeño conocido, a partir de su talla genómica. El genoma del VHB está constituido por una molécula de ADN circular de doble cadena parcial (ADNccc), con una de las cadenas incompleta. A esta molécula se le denomina crADN (*del inglés, circular re-laxed ADN*). La cadena negativa consta de aproximadamente 3.2 kilobases (kb) de largo y la cadena positiva presenta un tamaño variable entre 1.7-2.8 kb. El genoma del VHB codifica siete proteínas a partir de cuatro marcos abiertos de lectura (*ORFs, del inglés: Open Reading Frame*) S, P, C y X (Ríos-Ocampo *et al.*, 2013) (ver anexo 1).

Las funciones de las proteínas codificadas por el genoma del VHB se resumen en la (Tabla 1).

3.3.-Ciclo de replicación del VHB.

El ciclo de replicación del VHB (ver anexo 2) es un proceso, que a pesar de no conocerse con exactitud sus mecanismos, comienza con la unión del virión al receptor de membrana del hepatocito (Gerlich *et al.*, 2010).

Tabla 1.-Funciones de las proteínas codificadas por el genoma del VHB

Proteína (Sigla)	Función
Antígeno de superficie (HBsAg) forma: Mayor (L), Medio (M) y Pequeño (S)	Permiten la adhesión y penetración de la partícula viral a la célula hospedera. Blanco de respuesta inmunológica
Polimerasa viral	ADN Polimerasa, transcriptasa reversa (RT) y ARNasa H
Core (Antígeno Core: HBcAg) Antígeno e (HBeAg)	Subunidad estructural de la cápside viral. Posible inmunomodulador
Proteína X (HBx)	Transactivador de elementos reguladores virales y celulares, actividad oncogénica sugerida

En el mismo, la proteína pre-S (específicamente el dominio pre-S1), juega un papel principal en la interacción con el receptor celular. Luego de esta unión, los viriones liberan su nucleocápside al citoplasma, momento en el cual el core debe pasar al núcleo donde su ADN es reparado y convertido a ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc), gracias a un proceso catalizado por la ADN polimerasa viral (G Las partículas de la cápsida nuclear son liberadas dentro del citoplasma, transportadas hacia el núcleo) (Gerlich *et al.*, 2010).

El ADNccc expresa ácido ribonucleico pregenómico (ARNpg) y subgenómico. El subgenómico funciona exclusivamente como ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y en los ribosomas da lugar a las proteínas virales preS/S y a la proteína X (Seeger y Maison, 2000).

El ARNpg es de vital importancia en la replicación viral, pues sirve de molde para la síntesis del ADN viral y funciona como ARNm bicistrónico para las proteínas de la cápsida nuclear y la polimerasa viral (proteína P) (Nassal, 2008).

El HBcAg, la polimerasa y su ARNm/pg se ensamblan en el citosol dentro de las partículas de la cápsida inmadura, donde el ácido ribonucleico es reverso transcrito a ADN (Nassal, 2008).

La reverso transcripción se inicia con la síntesis de la cadena L (-). Simultáneamente a la formación de esta cadena se va degradando el ARNpg mediante el dominio funcional de la proteína P, ARNasa H; la cadena S (+) se sintetiza usando como molde la cadena L (-) y como cebador, un oligorribonucleótido resultante del ARNpg (Beltrán *et al.*, 2009; Beltrán *et al.*, 2011).

Las nuevas y maduras nucleocápsidas virales pueden seguir dos rutas intracelulares diferentes: una hacia la formación y secreción de nuevos viriones, mientras que la otra está dirigida hacia la amplificación del genoma viral dentro del núcleo. El proceso de salida de la célula de los nuevos viriones ocurre por gemación (Devesa *et al.*, 2008; Gerlich *et al.*, 2010) (ver anexo 2).

3.4.-Variantes moleculares

La heterogeneidad del HBsAg ha sido establecida por reacciones serológicas utilizando anticuerpos humanos y murinos que reconocen determinantes y subdeterminantes antigénicos de esta molécula, hasta el momento se han definido nueve subtipos serológicos del HBsAg: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, adw2, adw4, ayr, adrq+ y adrq- (Aghakhani *et al.*, 2010). La letra a representa una especificidad antigénica común a todos los subtipos del VHB. Las letras d/y y w/r respectivamente, denotan pares mutuamente excluyentes característicos de los subtipos antigénicos (Beck y Nassal, 2007).

3.4.1.-Genotipos virales.

La clasificación genética del VHB incluye 10 genotipos, designados por letras de la A-J, basados en diferencias mayores del 8% en la secuencia nucleotídica completa del virus (Gomaa *et al.*, 2008; Cooksley, 2010; Beltrán *et al.*, 2009; Beltrán *et al.*, 2011). Los sub genotipos son subgrupos de genotipos con una diferencia nucleotídica del genoma entre un 4% y 8%, y se clasifican en A1-7, B1-5, C1-6, D1-7, F1-4, H, I, J. Estos genotipos y subtipos muestran una amplia distribución geográfica, a saber: el genotipo A1 se encuentra en América del Norte, África subsahariana; A2 en el Norte de Europa, la india, América del Norte, América del Sur, y Australia; A3 en el oeste de África; genotipos B1 en Japón, B2 China, B3 Indonesia, B4 Vietnam, B5 Filipinas; C1 Sudeste de Asia, C2 Este de Asia, C3 Islas del Pacífico, C4 Australia, C5 Filipinas y Vietnam, C6 Alaska; el genotipo D en el Sur de Europa, la India y el Medio Oriente; D1 Región Mediterránea (incluido el Norte de África), Este Central, D2 en el Oriente de Europa, Subcontinente Hindú, Mongolia, D3 África del Sur, India, Región Antártida, D4 Somalia, Papúa-Nueva Guinea, Aborígenes de Australia, D5 India, D6 Indonesia; el genotipo E prevalece sólo en el Oeste de África; los genotipos F1-4 Alaska, América Central, Sur América. El genotipo G en Estados Unidos y Europa

(Liu y Kao, 2007; Gomaa *et al.*, 2008). El genotipo H predomina en América Central y del Sur y el genotipo I en Vietnam. El genotipo J se ha encontrado en Vietnam y Japón (Tatematsu *et al.*, 2009). De la misma manera, el estudio de los genotipos virales reviste suma importancia en la evaluación de las diferentes alternativas de tratamiento, toda vez que estos pueden influir en el éxito de la terapia antiviral (de la Hoz *et al.*, 2008; Cooksley, 2010; Gerlich *et al.*, 2010).

3.5.-Patogenia y manifestaciones clínicas.

Desde el punto de vista patogénico, el espectro de la infección aguda por el VHB varía desde la infección asintomática, hasta la hepatitis fulminante, dependiendo dicha variación, de factores relacionados con el virus y con el huésped. Las evidencias sugieren que las manifestaciones clínicas y la evolución del daño hepático agudo asociado con la hepatitis viral, quedan determinada por la respuesta inmunológica del hospedero (Pol, 2006). La Hepatitis B aguda es una infección sistémica que tiene un período de incubación, seguido de un período prodrómico o fase pre-ictérica, que puede durar desde unas pocas horas hasta días. Posteriormente se desarrolla un período o fase ictérica hasta concluir con período de convalecencia o fase post-ictérica (Ganem y Prince., 2004; Pungpapong *et al.*, 2007). La infección tiene una fase aguda, sintomática en el 50% de los adultos afectados, después de una incubación promedio de 120 días (40-180) (Previsani y Lavanchy, 2002).

La hepatitis sintomática es rara en neonatos (< 1%) y ocurre aproximadamente en el 10% de los niños de uno a cinco años de edad (Lavanchy, 2004; Liaw y Chu, 2009; Vildózola y Salinas, 2009). Una vez que la infección crónica con VHB se ha establecido, el curso de la enfermedad ocurre en cuatro fases: la fase de inmunotolerancia que está caracterizada por niveles normales de alanina aminotransferasa (ALAT), altos niveles de ADN viral en suero, HBeAg detectable y

típicamente mínima actividad en pruebas de biopsia hepática (Hui *et al.*, 2007; Lai *et al.*, 2007; Liaw, 2008).

La inmunotolerancia es mayormente vista en individuos que probablemente adquirieron la infección perinatalmente, y desarrollan el estado de portador o una fase muy activa en la adultez temprana (Wiwgard *et al.*, 2008). La fase de inmunoaclaramiento, conocida también como Hepatitis B crónica con HBeAg positivo, está asociada con elevados niveles de ALAT y ADN viral así como también daño hepático (Yuen *et al.*, 2005; Hoofnagle *et al.*, 2007; Lok y McMahon, 2007). La tercera fase se caracteriza por niveles normales de ALAT, niveles bajos de ADN viral en suero o indetectables, seroconversión del HBeAg y la presencia de anti-HBe. La última fase conocida también como Hepatitis B crónica con HBeAg negativo está asociada a niveles persistente o intermitentemente elevados de ALAT y ADN viral, además de daño hepático significativo (González y Keefe, 2009; Vildózola y Salinas, 2009).

3.6.-Diagnóstico virológico de la infección por VHB.

Tanto para el diagnóstico, como para determinar la etapa de la infección, y además evaluar la infectividad del paciente, los diferentes antígenos y anticuerpos detectables en el suero de los individuos infectados por el VHB, se constituyen en marcadores serológicos importantes (Morgan *et al.*, 2007). Durante la infección por VHB se observan el ADN viral y cuatro sistemas de antígenos-anticuerpos. En los sistemas comerciales disponibles que se emplean rutinariamente para el diagnóstico, se evalúan el HBsAg/anti-HBs, HBcAg/anti-HBc, y el HBeAg/anti-HBe (Tabla 2).

Tabla 2. Comportamiento clásico e interpretación clínica de los marcadores serológicos del VHB en el curso de la infección.

SIGLA	NOMBRE	DESCRIPCION E INTERPRETACION
HBsAg	Antígeno de superficie	Primer marcador que se detecta en suero. Si está presente al mismo tiempo que los anticuerpos IgM anti-HBc indica infección aguda. Si se mantiene positivo por más de 6 meses, indica infección crónica. Se negativiza cuando se resuelve la Hepatitis B.
HBeAg	Antígeno e	Detectable tanto en la fase aguda como en la infección crónica. Indica replicación viral activa. Indicativo de infección crónica si es reactivo por más de 6 meses.
Anti-HBs	Anticuerpos contra el HBsAg	Detectables de 1 a 3 meses después de la vacunación. Últimos marcadores que aparecen en el suero, indican recuperación e inmunidad.
Anti-HBe	Anticuerpos contra el HBeAg	Aparecen cuando el HBeAg ya no es detectable. Indican un pronóstico favorable.
IgM anti-HBc	Anticuerpos contra el HBcAg	Primera clase de anticuerpos detectables en un paciente infectado, indica infección reciente. Puede permanecer reactivo hasta 6 meses.
anti-HBc	Anticuerpos contra el HBcAg	Se mantienen reactivos durante años. Indican infección pasada o crónica. No se inducen por la vacunación ni indican inmunidad. Puede ser el único marcador detectable en el período de ventana cuando el HBsAg ya es negativo y los anti-HBs no han aparecido todavía.
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	Indica replicación viral activa. Permite además cuantificar la carga viral, establecer el genotipo y determinar el momento de iniciar la terapia antiviral. Es útil en el seguimiento de la infección.

3.7.-Tratamiento.

El objetivo del tratamiento de la Hepatitis B debe dirigirse a mantener controlada la replicación del virus para evitar el daño progresivo del hígado, reducir los síntomas, minimizar la inflamación crónica, y prevenir la progresión a fibrosis hepatocelular (Aggarwal y Ranjan, 2004; Morgan *et al.*, 2007).

El interferón alfa (IFN- α) ha sido el fármaco más empleado y ejerce doble función: inmunomoduladora y antiviral, uno de los medicamentos que se ha considerado como terapia

inicial para pacientes con HBeAg (+) o HBeAg (-), ha sido el Peginterferón (PEG-IFN). Además se han combinado el IFN con antivirales análogos de nucleósidos: Lamivudina, Adefovir, Entecavir y Clevudina (Ferir *et al.*, 2008; Beltrán *et al.*, 2011). Se recomienda que la carga viral deba medirse cada 3 ó 6 meses durante la terapia, pues ello permite supervisar la evolución de la infección, evaluar la terapia y así identificar aquellos pacientes que no responden positivamente al tratamiento (Sirma *et al.*, 2007; Volz *et al.*, 2007; Tillmann, 2007; Liaw y Chu, 2009). La mayoría de los ensayos clínicos publicados han utilizado como criterios de eficacia del tratamiento: pérdida del HBeAg, presencia de anti-HBe, y reducción de los niveles de ADN viral $<10^5$ copias/mL, 24 semanas después de haber concluido la terapéutica (Raíces, 2011).

3.8.-Epidemiología.

La Hepatitis B, es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo, tanto por su presentación en las formas agudas y crónicas, como por sus secuelas, en la actualidad se estima que un tercio de la población mundial ha sido infectada por este virus (2000 millones aproximadamente), de los cuales se considera que existen más de 350 000 portadores del VHB a nivel mundial que han desarrollado a la cronicidad (Lavanchy, 2005; Shepard *et al.*, 2006; McGovern, 2007; Monsalve-Castillo *et al.*, 2008; Liaw y Chu, 2009, Ríos-Ocampo *et al.*, 2013). Se reconocen como vías de transmisión fundamentales la infección perinatal, percutánea y sexual (Cirión *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Raíces, 2011).

El VHB es transmitido a través de sangre o fluidos contaminados, tales como: el semen, secreciones vaginales, saliva y otros (Muzio y Pentón, 1998). La vía perinatal constituye la más importante ruta de transmisión de este virus a nivel mundial (Coopstead y Lee, 2010). Está comprobada la transmisión del VHB de la madre al feto, siendo la mayoría de las embarazadas portadoras asintomáticas del mismo (Hamdani y Bouzzaou, 2000). La tasa de infección en recién

nacidos de madres HBsAg (+) y HBeAg (-) es de un 10%, y 70-90% para los nacidos de madres con HBsAg (+) y HBeAg (+) (Mast *et al.*, 2004). El contagio puede ocurrir intraútero (transplacentaria), durante el parto por el intercambio de sangre materno-fetal y la exposición a secreciones en el canal del parto. La eficacia protectora de la vacunación neonatal es tan alta (95%) que obliga a pensar que el contagio ocurre, sobre todo, durante el parto o después del nacimiento aunque los mecanismos de transmisión no son del todo conocidos (Hill *et al.*, 2002).

La probabilidad de que el bebé se infecte en el momento del nacimiento varía de 10 a 90%, en dependencia de si la madre se encuentra, o no, en la fase de replicación viral activa, respectivamente (Hollinger *et al.*, 2007). En el caso de los niños, la cronicidad de la infección por el VHB depende del modo de transmisión y el momento de la infección. Cuanto menor es la edad en la adquisición de la infección mayores son las posibilidades de evolución a la cronicidad (Galoppo, 2010). La transmisión madre/hijo puede establecerse también por los cuidados de la madre al niño durante los primeros años de vida y está demostrado que la lactancia materna puede ser otra vía de contagio, lo que no ocurre cuando el bebé se encuentra inmunizado (Shi *et al.*, 2011).

La transmisión por vía parenteral/percutánea, que involucra la exposición directa a la sangre u otros fluidos infectados, incluye las transfusiones de sangre infectada, así como la administración parenteral de hemoderivados contaminados, el uso compartido de jeringuillas y agujas no esterilizadas, en el caso de los usuarios de drogas parenterales, la exposición a los procesos de hemodiálisis, la acupuntura y la práctica de tatuajes, entre otros. El riesgo de transmisión postransfusional ha disminuido en la actualidad debido al implemento, con carácter obligatorio, del pesquisaje de toda la sangre donada. La transmisión por contacto sexual constituye una de las principales vías en los países desarrollados, junto al uso de drogas parenterales y la exposición ocupacional. Hay un amplio rango de la prevalencia en distintas partes del mundo, la que varía

entre un 0,1% hasta un 20%. Las áreas de baja prevalencia (0,1-2%) son Oeste de Europa (con una amplia variación dentro del continente), Estados Unidos y Canadá, Australia y Nueva Zelanda; Países mediterráneos, Japón, Asia central, el Este medio y Sudamérica tienen una prevalencia media (3-5%); y los países con alta prevalencia (10-20%) son el Sudeste de Asia, China y África sub-Sahariana (Mauss *et al.*, 2009). En Latinoamérica, la prevalencia para el HBsAg es alta en la cuenca Amazónica entre Brasil, Colombia, Venezuela y Perú; intermedia en Guatemala y Honduras, y baja en Cuba, Chile, México, Argentina y Uruguay (Ramírez-Soto *et al.*, 2011). El período de incubación varía entre 40 y 180 días. No existe un patrón estacional para la infección y las epidemias son poco usuales (Hollinger, 2007).

3.9.-Prevención y control.

La piedra angular de la Hepatitis B es la prevención y el control, pero la eficacia de las mismas depende de múltiples factores, entre los que se destacan: la selección y el pesquizaje adecuado de los donantes de sangre, la educación de la población en cuanto a las formas de transmisión, el uso de procedimientos ambientales para limitar el riesgo de infección, las medidas de seguridad en el manejo de los fluidos corporales, la sangre, sus derivados, y una adecuada inmunoprofilaxis (Ganem y Price, 2004; Aggarwal y Ranjan, 2004). El primer factor a considerar es la vacunación. La misma tiene la capacidad de reducir la infección persistente y la enfermedad según se vaya aplicando, pero para lograr la efectividad del proceso de inmunización, se requiere que sea extendido a varias generaciones, sobre todo en los países de mayor prevalencia (Raíces, 2011). Se ha demostrado que títulos de anti-HBs ≥ 10 UI/L inducidos por la vacuna contra el VHB protegen contra la infección o persistencia del mismo (Gerlich *et al.*, 2010).

En nuestro país, los logros alcanzados en el control de la Hepatitis B, se deben fundamentalmente, a la existencia de la vacuna Heberbiovac-HB®, pues ha demostrado ser altamente inmunogénica,

y sus excelentes resultados han permitido incorporarla al esquema de vacunación infantil y a la inmunización de los grupos de alto riesgo de infección (Jauma *et al.*, 2009; Pedroso *et al.*, 2010; Panduro *et al.*, 2011). Actualmente la población cubana menor de 34 años se encuentra inmunizada contra la infección por el VHB. (Dra. Licel de los Á Rodríguez y colaboradores. IPK, La Habana, Cuba (comunicación personal, 21 de Enero, 2014).

Entre las estrategias para reducir el número de infectados, una que cada vez cobra mayor importancia la constituye la prevención en la transmisión vertical del VHB. En este sentido, todas las mujeres embarazadas deben ser analizadas para determinar la posible presencia del HBsAg, sea en la primera visita al ginecólogo, o en el tercer trimestre del embarazo, dichos análisis deberían repetirse durante el embarazo en aquellas mujeres en las que el riesgo de contagio por VHB sea alto, y en el caso de aquellas que sean portadoras del VHB, el recién nacido debe ser vacunado y recibir además, inmunoglobulinas específicas frente al VHB antes de las 12 horas después de nacido, para de esta forma reducir entre un 95 y 99% la transmisión (Liaw *et al.*, 2008). Para el caso de las madres con elevada viremia deben recibir terapia adicional con potentes inhibidores de la polimerasa (EASL, 2009; Xu *et al.*, 2009).

3.10.-Infección Oculta por VHB (IOB): algunos aspectos generales.

Tradicionalmente, el diagnóstico de infección por VHB se ha realizado por pruebas serológicas, en las cuales se busca la presencia de HBsAg. Sin embargo, se sabe que existe un grupo de pacientes que al realizarle la serología, generan resultados negativos sobre la presencia del HBsAg, pero positivos al anti-HBc y al ADN viral (Shi y Zhuang, 2005; Ríos-Ocampo *et al.*, 2013).

Se ha nombrado en la literatura de múltiples formas: “personas con infección inaparente por el VHB”, “Hepatitis B silente”, “portador de HBsAg negativo”, y finalmente, “Infección del VHB no conocida”, pero el término más usado en la actualidad es el de IOB (Ríos-Ocampo *et al.*, 2013).

El aclaramiento sérico del HBsAg usualmente confiere un excelente resultado a largo plazo si no hay cirrosis pre-existente o superinfección viral; sin embargo una pequeña cantidad de ADN-VHB puede persistir constituyendo la fase HBsAg negativo o IOB. Aunque el anti-HBs está considerado como el marcador clásico de protección adquirida ya sea, a partir de infección pasada resuelta o mediante la vacunación, en algunos casos sin embargo, se ha detectado ADN viral en pacientes que poseían baja inmunidad contra el HBsAg. Biológicamente el aclaramiento del virus es clásicamente caracterizado por la emergencia de anti-HBs en el perfil serológico; sin embargo el virus puede perpetuarse debido a su peculiar ciclo de vida, que permite la conversión del genoma del VHB en un ADNccc, que persiste de por vida en el núcleo de las células como un episoma cromatinizado y que sirve como modelo para la transcripción del gen. La estabilidad y larga persistencia de las moléculas virales ADNccc, junto con la larga vida media de los hepatocitos implica que la infección con VHB, una vez que ha ocurrido podría continuar toda la vida (Vildózola y Salinas, 2009).

Una pregunta que aun no tiene respuesta es por qué los portadores de IOB son HBsAg (-) a pesar de la presencia de episoma en el hígado, de genomas libres. Hay varias posibilidades, desde variantes del virus que producen una proteína S modificada, indetectable por los métodos actuales, o mutaciones capaces de inhibir la expresión del gen S y/o la replicación del virus. Lo más aceptado actualmente es que la IOB, parece ser principalmente debido a una fuerte supresión de la replicación viral y la expresión del gen que afecta a los virus cuya variabilidad genética es comparable a la de las cepas de VHB de individuos con infección crónica VHB "abierta". Esta afirmación tiene algún respaldo en diferentes reportes que afirman que la IOB puede ser transmitida experimentalmente a chimpancés y por transfusión de sangre o trasplante de órganos a humanos, induciendo una Hepatitis B aguda clásica en el recipiente, y los portadores de IOB

pueden mostrar una reactivación aguda de la infección con la reaparición del perfil serológico típico de Hepatitis B, cuando reciben quimioterapia sistémica, radioterapia o inmunoterapia. Todas estas afirmaciones sobre la transmisibilidad y reactivación de la IOB son en parte aceptadas, por lo menos teóricamente, aunque requiere posterior evaluación (Vildózola y Salinas, 2009).

Es importante considerar en la génesis de la IOB, la llamada interferencia viral, como un factor que influencia negativamente la replicación del VHB y la expresión del gen. Esto se ha observado en la coinfección con otros virus, como es el caso de la coinfección con el VHC, donde se ha encontrado la más alta prevalencia de IOB y en estudios *in vitro* donde se demostró claramente que la proteína core del VHC fuertemente inhibe la replicación del VHB. También se ha reportado alta prevalencia en drogadictos endovenosos, hemofílicos; por el contrario hay resultados divergentes en pacientes en hemodiálisis con prevalencias que van de 0 a 36% y en pacientes con VIH (Vildózola y Salinas, 2009).

La IOB se ha visto en pacientes con las siguientes situaciones: Personas con factores de riesgo de VHB, Hepatocarcinoma, portadores crónicos del VHB, coinfección VHB-VHC, Inmunosuprimidos personas con aumento inexplicable de enzimas hepáticas o cirrosis criptogénica, pacientes con anti-HBc total, pacientes infectados por el VIH y coinfección VIH/VHC (Torbenon y Thomas, 2002).

3.10.1.-Infección Oculta por VHB (IOB) en hijos de madres HBsAg (+).

La IOB se ha podido determinar con relativa frecuencia en niños, hijos de madres HBsAg (+) (Shahmoradi *et al.*, 2012). Los recién nacidos constituyen un importante grupo de riesgo de contraer el virus, de manera vertical a través de su madre. Durante la gestación, la placenta impide el paso del VHB completo y del HBsAg. Sin embargo, la transmisión perinatal se atribuye a microrroturas en la placenta y al contacto del niño con secreciones y sangre en el momento del

parto. En las mujeres con HBeAg, el antígeno pasa la placenta y puede detectarse en dos tercios de los recién nacidos, a títulos que no guardan correlación con el título materno. En el niño no infectado, el HBeAg transferido deja de detectarse entre los 6 y 12 meses de vida. El paso transplacentario de HBeAg puede ser el motivo de la alta tasa de cronicidad de la Hepatitis B y peculiar evolución inmunotolerante cuando hay transmisión vertical del VHB a partir de madres HBeAg (+) (Cabezas-Sánchez y Donayre, 2010, Chakvetadze *et al* 2011).

Según lo reportado por Galoppo, 2010 durante la infancia y sobre todo la adolescencia más del 80% de los pacientes con VHB seroconvierten a HBeAg, con remisión bioquímica y permanecen como portadores asintomáticos del HBsAg, sin viremia aparente ni alteraciones enzimáticas (Galoppo, 2010). En consecuencia, el pronóstico de la Hepatitis B adquirida en la infancia debería ser favorable durante ésta edad de la vida. Sin embargo, 90% de los pacientes son portadores del HBsAg y llegan a adultos, 50% son todavía ADN-VHB positivos diez años después de la seroconversión anti-HBe. En la actualidad se reconoce a la IOB como una entidad con implicaciones clínicas importantes, las cuales incluyen además del riesgo de transmisión de la infección por transfusión sanguínea o trasplante de órganos, la exacerbación de la infección y la progresión a CH o CHC (Raimondo *et al.*, 2008; Raimondo *et al.*, 2010; Ríos-Ocampo *et al.*, 2013). De ahí su importancia y el creciente interés al respecto en los últimos años. Una importante característica de la IOB es su impacto epidemiológico respecto al riesgo de transmisión de la infección por VHB y el desarrollo de hepatopatías terminales, más aun cuando su diagnóstico es un evento casual bien sea porque unidades de sangre son tamizadas para VHB o porque los individuos presentan alteración del perfil serológico del hígado (niveles de ALT) sin una etiología esclarecida (Ríos-Ocampo *et al.*, 2013).

Esto se hace mucho más complejo cuando se trata de niños, pues cuanto más precoz es la infección por VHB, mayor es la probabilidad de que ésta sea asintomática, y que su evolución se asocie a una mayor prevalencia de CH y de CHC (Ciri3n *et al.*, 2010; Shahmoradi *et al.*, 2012). Sumado a lo anterior, se encuentra la alta probabilidad de que dicha infecci3n concomite con otras patologías o infecciones virales, como es el caso de la alta prevalencia encontrada en niños que sufren de cáncer. La complejidad de este fenómeno está dada por el hecho de que la quimioterapia puede reactivar la presencia del virus, y hacerlo cr3nico o llevarlo a una fase aguda (Espinoza-Holguín *et al.*, 2006).

Otro aspecto importante relacionado con IOB es la reactivaci3n de la infecci3n. La IOB podría considerarse como un estado de regulaci3n negativa de la replicaci3n viral y de la expresi3n de las proteínas virales. Esta reactivaci3n de la infecci3n se presenta en pacientes bajo condiciones de inmunosupresi3n inducidas por terapias y/o enfermedades que deprimen el sistema inmunol3gico, como pueden ser enfermedades hematol3gicas, infecci3n por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y trasplante de médula ósea, entre otras (Ríos-Ocampo *et al.*, 2013).

Generalmente la reactivaci3n es un evento transitorio pero subsecuentes episodios pueden observarse en el mismo paciente, con lo que el pron3stico de la enfermedad es reservado. La cirrosis hepática es una complicaci3n temprana de la VHB en niños más que el estadio final de una enfermedad hepática de larga evoluci3n. Durante las primeras dos décadas de la vida, solamente 3 a 5% de los niños con Hepatitis B cr3nica presentan cirrosis, diagnosticada en la presentaci3n de la enfermedad o pocos meses más tarde. El pron3stico es severo, dado que 30-50% de estos pacientes pueden desarrollar CHC durante la edad pediátrica. La determinaci3n periódica de alfafetoproteína y la realizaci3n de ecografía hepática son indispensables en la evaluaci3n de estos pacientes (Galoppo, 2010). La administraci3n de la Inmunoglobulina Humana anti-Hepatitis B (IGHB) al

nacimiento de los hijos de madres HBsAg (+) no es totalmente efectiva en la prevención de IOB (Pande *et al.*, 2013). Los hijos de madres HBsAg (+) que son asintomáticos deben seguirse cuidadosamente, conociendo que la IOB puede producir enfermedades graves del hígado. Como hemos dicho el HBsAg (-) no excluye la posibilidad de ser portador del VHB.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.-Universo de estudio.

El universo de estudio estuvo constituido por todas las muestras de los hijos de madres HBsAg positivas que arribaron al Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis virales (LNRHV) procedentes de todo el país, en el período del 2007 al 2012. Los niños nacidos en el periodo 2007-2008 no recibieron IGHB al momento del nacimiento, solamente vacuna recombinante cubana Heberbiovac-HB®, mientras que los nacidos posteriormente si recibieron ambos productos.

4.2.- Muestra.

La muestra quedó conformada por un total de 291 muestras de suero pertenecientes a los hijos de madres con HBsAg (+) procedentes de todo el país, recibidas en el LNRHV, Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), en el período 2007-2012, como parte de la vigilancia que sigue el Ministerio de Salud Pública (MINSAP) a estos niños de riesgo. Estas muestras cumplían la condición de ser HBsAg (-) y anti-HBs menor de 50UI/L [títulos <10UI/L 92 (31,6%) y entre 10-49,9UI/L 199 (68,4%)]. En relación al sexo, 132 (45,4%) eran del sexo masculino y 159 (54,6%) eran del sexo femenino. La edad de los infantes incluidos, así como la distribución por provincias se muestra en la Tabla 3 y 4 respectivamente.

Nota: Se debe comentar que en el presente estudio los datos de los niños se obtuvieron en el periodo 2007 al 2010 con la antigua Ley Político-Administrativa: Provincia Habana (ahora Provincias Artemisa y Mayabeque).

Tabla 3: Distribución por edades de los niños incluidos en el estudio.

Edad	No.	%
7 meses	101	34,7
18 meses	68	23,4
2 años	6	2,1
3 años	67	23,0
5 años	49	16,8
Total	291	100

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012.

Tabla 4. Distribución de las muestras según provincias de origen.

Procedencia	Población	%
Pinar del Rio (PR)	107	36,8
La Habana (LH)	71	24,4
Artemisa (AR)	10	3,4
Mayabeque (MY)	2	0,7
Isla de la Juventud (IJ)	1	0,3
Matanzas (MT)	1	0,3
Cienfuegos (CF)	6	2,1
Villa Clara (VC)	4	1,4
Sancti Spíritus (SS)	7	2,4
Ciego de Ávila (CA)	6	2,1
Camagüey (CM)	1	0,3
Las Tunas (LT)	2	0,7
Granma (GM)	0	0
Holguín (HO)	23	7,9
Santiago de Cuba (SC)	11	3,8
Guantánamo (GT)	39	13,4
TOTAL	291	100

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012.

Se colectó 1 mL de suero de cada paciente y se conservó a -20° C hasta su utilización. Se confeccionó una base de datos, donde se incluyeron datos sociodemográficos, obtenidos de la base de datos del laboratorio de hepatitis virales, IPK, de los niños seleccionados. Para mejor comprensión de la metodología empleada durante la investigación se muestra el algoritmo de trabajo (Figura 2).

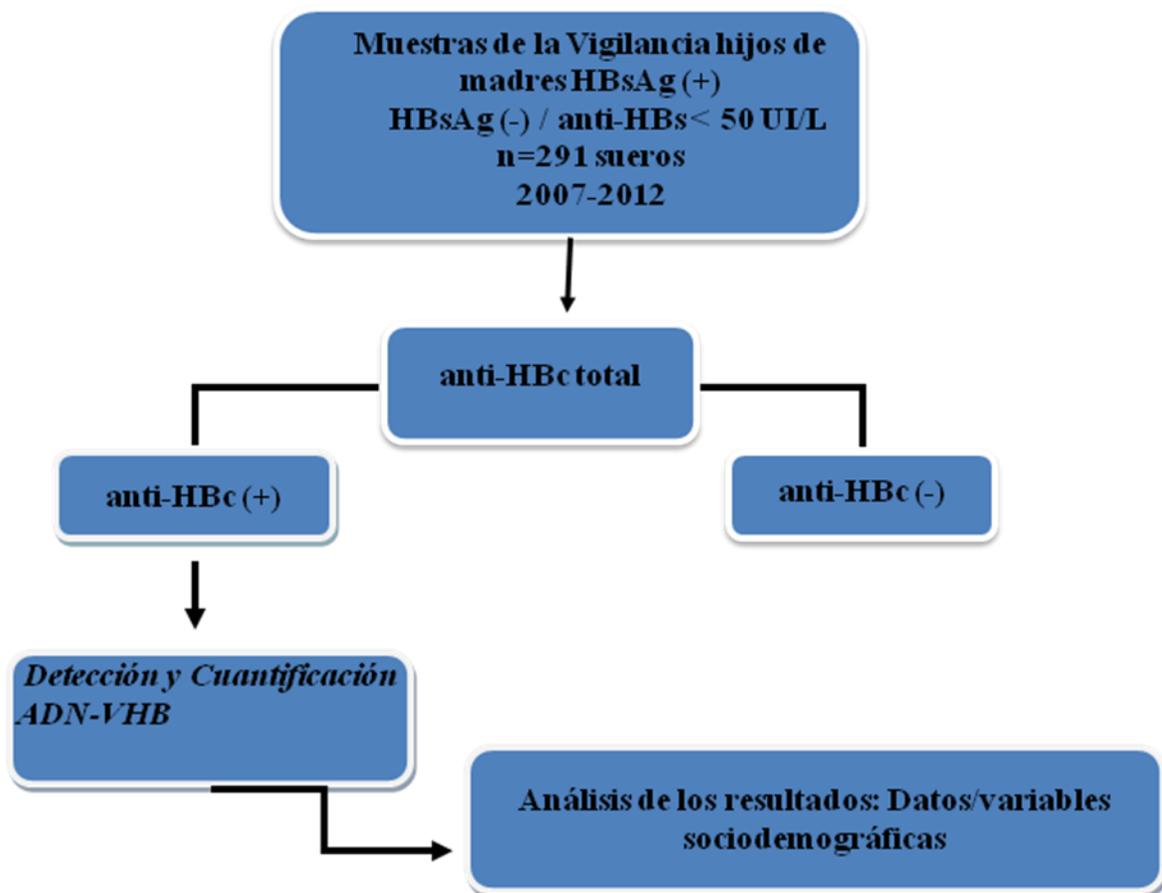


Figura 2: Algoritmo de trabajo

4.2.1.-Criterios de Inclusión.

Dado que la unidad de análisis seleccionada para el estudio estuvo constituida por las muestras de suero de hijos de madres con HBsAg (+), como criterios de inclusión, se seleccionaron las muestras de suero de aquellos niños, que:

- Fueran entre 7 meses y 5 años de edad.
- Que las muestras fueran procesadas en el IPK entre los años 2007-2012 (incluidos estos años).
- Y que las muestras cumplieran la condición de ser HBsAg negativas, y anti-HBs menor de 50 UI/L.

4.2.2.-Criterios de Exclusión.

Se decidió excluir del estudio, aquellas muestras de niños que cumplieran con los anteriores criterios, pero que la cantidad no fuera suficiente para poder realizar los análisis requeridos.

4.3.-Técnicas serológicas.

4.3.1.-UltramicroELISA para detectar anti-HBc total (UMELISA anti- HBc).

Esta prueba se les realizó a todos los pacientes incluidos en el estudio para conocer la exposición al VHB. Es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo, tipo indirecto; desarrollado por el Centro de Inmunoensayo (CIE), La Habana, Cuba.

Se utiliza como fase sólida tiras de reacción revestidas con el HBcAg, obtenido por vía recombinante. En una cubeta de dilución se distribuyó 10 micro Litros (μL) de una solución estabilizadora y se añadió 30 μL de cada muestra. Luego se procedió adicionar 10 μL por pocillo en

las tiras de reacción de las muestras, y de los controles positivo y negativo que se suministraban listos para el uso (LPU), los que se incubaron durante 1 hora a 37 °C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura. Los anticuerpos específicos presentes en las muestras positivas se fijaron al antígeno en fase sólida y el material no unido específicamente se eliminó mediante lavados (6 ciclos) en lavador MW2001 (TecnoSUMA, Cuba), con la solución de lavado incluida en los reactivos del estuche.

Los complejos antígeno-anticuerpos se detectaron mediante la adición de 10µL por pocillo de conjugado anti-HBc/fosfatasa alcalina (F.A), que se incubó 1 hora (hrs) a 37°C en cámara húmeda. Después de 6 ciclos más de lavado, se adicionaron 10µL por pocillo de sustrato 4 metilumbeliferil fosfato.

La placa se mantuvo en incubación por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. La validación e interpretación de los resultados se realizó automáticamente por el lector (PR-521, TecnoSUMA, Cuba) y programa UMELISA anti-HBc. La validez de la prueba y la interpretación de los resultados fueron realizadas automáticamente por el programa correspondiente (Paquete de Software para lectores de tiras versión 8.0).

Las muestras con valores de fluorescencia inferiores o iguales al producto de 0.2 por la media del control positivo se consideraron positivas. Mientras que, los sueros con resultados superiores se consideraron negativos. Un resultado negativo indicó que el paciente no tenía anti-HBc. Resultados repetidamente positivos al menos en dos ocasiones con la misma muestra, indicaron que el paciente tenía anticuerpos totales contra el HBcAg.

4.4.-Técnicas moleculares

Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo Real (RCP-TR) para detectar y cuantificar el VHB.

La RCP-TR se empleó para detectar y cuantificar el ADN-VHB en las muestras anti-HBc (+) / anti-HBs < 50 UI/L.

4.4.1.-Extracción del ADN-VHB.

Se utilizó el estuche QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemania) para extraer el ácido nucleico del VHB a partir de 200µL de suero. Brevemente se le añadió proteinasa K (QIAGEN proteasa) y tampón de lisis (AL). Después de dar vórtex se incubó a 56°C durante 10 minutos (min). Se adicionó etanol absoluto (96-100%), y se transfirió toda la mezcla a una columna QIAamp mini spin para luego centrifugar a 8 000 rpm (revoluciones por minutos) durante 1 min descartando el filtrado. Se agregaron 500µL de tampón de lavado 1 (AW1) a la columna QIAamp mini spin y se volvió a centrifugar a 8 000 rpm durante 1 min desechando el filtrado. A continuación se adicionaron 500µL de tampón de lavado 2(AW2) y se centrifugó a 14 000 rpm por 3 min eliminando el filtrado. Finalmente, para la elución de los ácidos nucleicos adheridos a la columna QIAamp mini spin se agregaron 200µL de tampón de elusión (AE), se dejó incubar a T° ambiente (20-25°C) por 1 min y luego se centrifugó a 8 000 rpm durante 1 min. El ADN extraído se conservó a -70°C hasta su posterior utilización.

4.4.2.-RCP-TR (Estuche Comercial artus HBV LC PCR kit, Qiagen, Alemania) para la cuantificación del genoma del VHB.

El estuche comercial artus HBV LC PCR Kit constituye una prueba rápida para la cuantificación del ADN del VHB usando el equipo LightCycler 1,5 System - Roche® para la amplificación y detección.

La mezcla de reacción (*HBV LC Master*) contiene reactivos y enzimas para la amplificación específica de una región del genoma del VHB de 134 pares de bases (pb). Este estuche posee un segundo sistema heterólogo de amplificación para identificar posible inhibición de la RCP.

Para la amplificación y detección se preparó la mezcla de reacción consistente en:

Mezcla LightCycler (*LC Master*) 12µL, solución de MgCl LightCycler (LC Mg-Sol) 3µL y Control Interno LightCycler (LC IC) 0,5µL para un volumen final de 15.5µL. La misma se dispensó a razón de 15µl por capilar y luego se añadieron 5µl del ADN extraído.

Las muestras se colocaron en un equipo de RCP-TR LightCycler 1,5 System - Roche® con el programa que se describe a continuación: 95°C por 20 segundos (seg.) y 45 ciclos compuestos por 95°C durante 1 seg. 55°C por 15 seg. y 72°C durante 1 seg. Para realizar la técnica se emplearon controles internos y controles negativos en cada corrida. La emisión de fluorescencia se realizó en cada ciclo al final de la fase de hibridación, con el canal de detección de fluorescencia fijado en F2/Back-F1. El control interno se detecta en el canal F3/Back-F1. La concentración de la curva estándar suministrada por el fabricante oscila de 10¹UI/ µL hasta 10⁵ UI/µL. De esta forma, mediante la interpolación de los datos obtenidos de cada muestra se calcularon los valores de la carga viral en UI/mL utilizando la siguiente fórmula: (Qiagen, Manual de Operaciones *artus HBV LC PCR Kit*).

$$\text{Resultados UI/mL} = \text{Resultados UI/}\mu\text{L} \times \text{Vol. de elusión } \mu\text{L} / \text{Vol. de muestra (mL)}$$

4.4.3.-Definiciones utilizadas en la investigación.

Criterios de exposición al VHB: La evidencia de exposición fue definida por la presencia de anti-HBc en el suero.

Criterios de seroprotección al VHB: La seroprotección fue definida como título de anti-HBs igual o mayor a 10 UI/L. De acuerdo a este título la calidad de la respuesta fue clasificada en:

No respondedores: Cuando el título anti-HBs < 10 UI/L.

Hiporrespondedor: Cuando el título anti-HBs se encontraba entre 10 y 99 UI/L.

Criterios de IOB: Fue definida como presencia de ADN-VHB y anticuerpos contra el antígeno del núcleo (anti-HBc), en ausencia del HBsAg.

4.5.-Consideraciones éticas.

Las muestras (suero) utilizadas formaban parte de la seroteca existente en el Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales (LNRHV). Cuando el médico de asistencia indicó la toma de muestra, le explicó al paciente que se le harían varios marcadores de Hepatitis B de ser necesario, según los resultados obtenidos. Se confeccionó una base de datos con una clave para su acceso donde se incluyeron los resultados logrados en la investigación; accediendo a la información solo los investigadores del laboratorio. Los datos obtenidos de este estudio solo fueron utilizados en esta investigación y para el bienestar de los pacientes. Se les informará a los médicos de asistencia los resultados obtenidos mediante un informe técnico para que consideren la conducta a seguir con cada paciente, hacer estudios más profundos que completen su perfil hepático, aplicar tratamiento adecuado y mejorar así su calidad de vida.

4.6.-Análisis estadístico.

La totalidad de la información fue procesada de forma automatizada. Con los datos obtenidos se creó una base de datos en el Programa Microsoft Office Excel 2007 y para los cálculos y análisis estadísticos se emplearon los Programas Epidat 3.1 y EpiInfo 2002.

El análisis incluyó la estimación de porcentajes, la prevalencia de exposición al VHB, prevalencia de IOB en muestras positivas al Anti-HBc en hijos de madres positivas al HBsAg para lo cual se procedió de la siguiente forma:

Para el cálculo de la Prevalencia de exposición al VHB:

$$\text{Prevalencia de anti-HBc(+)} = \frac{\text{Número de pacientes anti-HBc (+)}}{\text{Total de pacientes estudiados}} \times 100$$

Para el cálculo de la Prevalencia de Infección oculta por el VHB (IOB):

$$\text{Prevalencia de IOB} = \frac{\text{Número de pacientes con ADN-VHB}}{\text{Total de pacientes anti-HBc (+) con título < 50 UI/L de anti-HBs}} \times 100$$

Se realizó un análisis univariado para determinar el grado de asociación de las variables sociodemográficas seleccionadas (edad, sexo y los diferentes títulos de anti-HBs (Anti-HBs <10 UI/L y 10-49,9 UI/L), con la presencia de IOB.

Se empleó la razón de prevalencia (RP) y su intervalo de confianza (IC) 95%, como medida de asociación. Una vez procesados y analizados los datos, estos fueron presentados en tablas y figuras, con el auxilio de los paquetes de programas Microsoft Office Word 2007 y Microsoft Office Power Point 2007.

V.-RESULTADOS Y DISCUSION.

En Cuba la infección por el VHB no es de alta prevalencia en relación a otras regiones del mundo. Desde 1992 se incorpora la vacuna anti-Hepatitis B al programa de Inmunizaciones, además se vacunaron los principales grupos de riesgo de infección por el VHB (pacientes seropositivos al VIH, personal de salud, diabéticos, asmáticos, pacientes con enfermedades renales en estadio terminal, entre otros). Con esta estrategia se ha logrado reducir la Hepatitis B aguda en un 99% y desde hace varios años, no existe la Hepatitis B aguda en los menores de 15 años.

Gracias al desarrollo en los últimos diez años de técnicas altamente sensibles para la identificación del genoma del VHB, nace una nueva entidad conocida como IOB que ha cobrado importancia clínica y epidemiológica por las complicaciones clínicas e impacto en la prevención y control de la Hepatitis B. En la actualidad existe un creciente interés al respecto, realizándose investigaciones en diferentes grupos poblacionales, sanos y de riesgo.

5.1.-Prevalencia de exposición al VHB en hijos de madres positivas al HBsAg, según sexo y lugar de procedencia, 2007-2012.

La prevalencia global de anti-HBc en la muestra total de niños estudiados fue 16,8% (49/291). En el sexo masculino 20 fueron positivas al anti-HBc total, con un 15,2% (20/132). En el sexo femenino se constató una positividad de 18,2% (29/159) (Tabla 5).

Al evaluar la prevalencia de exposición al VHB por provincias, los mayores registros se ubicaron en: Matanzas 100% (1/1), Cienfuegos y Ciego de Ávila cada una con 33,3% (2/6), Guantánamo con un 25,6% (10/39), y Holguín con un 21,7% (5/23).

Sin embargo, el mayor número de casos absoluto de anti-HBc (+) se reportó en las provincias de Pinar del Río (14/107), La Habana (11/71) y Guantánamo (10/39) respectivamente. En las provincias de Pinar del Río, La Habana, Artemisa, Sancti Spíritus y Santiago de Cuba, la prevalencia de anti-HBc osciló de 13,1% a 18,2%. Este indicador se igualó a cero, en Mayabeque, Isla de la Juventud, Villa Clara, Camagüey, Granma y Las Tunas (Figura 3).

Tabla 5. Prevalencia de exposición al VHB (anti-HBc) en hijos de madres positivas al HBsAg, 2007 a 2012.

Muestras	Anti-HBc (+)	
	n	%
Sexo masculino n=132	20	15,2
Sexo femenino n=159	29	18,2
Total n=291	49	16,8

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales, IPK/2007-2012

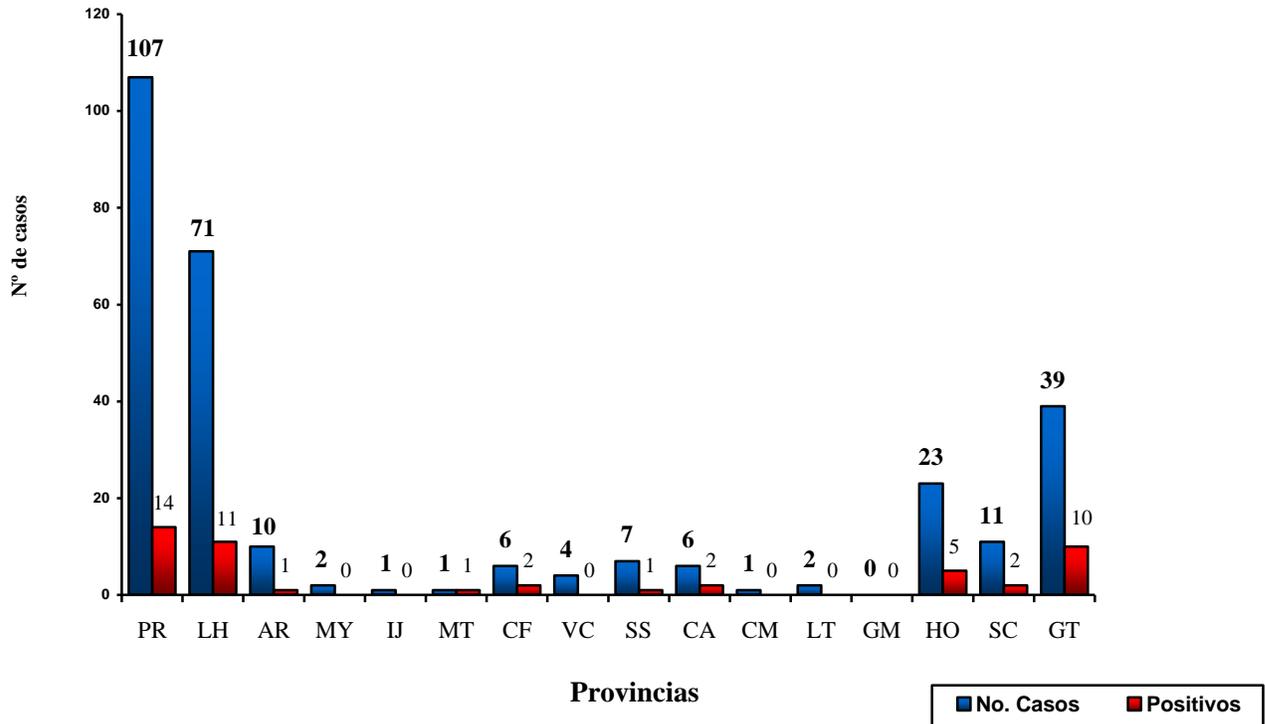


Figura 3. Exposición al VHB en hijos de hijos de madres HBsAg (+), según provincias de residencia (n=291).

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012

Resultados superiores a lo que se obtuvo en este trabajo fue reportado por Bello y colaboradores en un estudio realizado en 200 niños cubanos de 7 meses de edad, hijos de madres HBsAg (+), de ellos el 47,5% (105/200) fueron anti-HBc (+). No obstante, en este mismo estudio al tomarse una segunda muestra a los 18 meses para conocer si estos anticuerpos persistían se hallaron 4/22, 18,2% infantes con anti-HBc (+) (Bello *et al.*, 2006), siendo esta cifra cercana a la obtenida en la presente investigación.

Otros estudios llevado a cabo en diferentes grupos de riesgo en pacientes de edades pediátricas cubanos, se encontró la prevalencia de exposición al VHB más elevada en los niños hemodializados (60%), seguido por los niños con cáncer (12,5%) y la más baja en los niños coinfectados con el VIH (10%) (Bello *et al.*, 2010; Sariago, 2008).

Al comparar los resultados con la literatura internacional, encontramos que en una investigación similar realizada en China, zona de elevada prevalencia de HBsAg, donde se estudiaron 546 niños entre 1 y 7 años, hijos de madres HBsAg (+) con inmunización pasiva-activa al nacimiento, se constató que el 3,1% tenía anti-HBc (+), un índice de positividad cinco veces más bajo que el detectado en este estudio (Chen *et al.*, 2013). Este resultado aparentemente contradictorio podría estar relacionado con la edad donde se encontró la positividad más elevada a los anti-HBc en nuestro estudio, lo cual será discutido en una sección más adelante.

Diversos estudios se han llevado a cabo en grupos de riesgo para la Hepatitis B en edades pediátricas, en diferentes zonas geográficas. En Chile, Zubieta y colaboradores demostraron una baja positividad del VHB en niños con tratamiento oncológico, detectándose el anti-HBc positivo el 5,9% (10/168) de los niños estudiados (Zubieta *et al.*, 2009). En Perú un estudio de prevalencia del VHB en niños con cáncer arrojó una alta positividad del marcador de exposición del virus con un 7,1% de casos anti-HBc (+) (Espinoza-Holguín *et al.*, 2006). Asimismo, una elevada detección de anti-HBc se detectó en niños y adolescentes de Egipto con enfermedades hematológicas malignas, encontrándose prevalencia de 33% (15/49) (Said *et al.*, 2009). Estas prevalencias están relacionadas con la patología de base de los niños de estudio, unido a la prevalencia general del VHB en dichos lugares.

En Cuba se han estudiado diferentes grupos de riesgo ya sea adolescentes y adultos, en los que se demostró prevalencias más elevadas de anti-HBc.

Aunque las edades no son comparables, estos resultados nos dan una medida de la circulación del VHB en estos grupos de riesgo, así como la eficacia de las estrategias de vacunación seguidas por las autoridades de salud en estos pacientes. Rodríguez y colaboradores (2000), en pacientes VIH detectaron un 45,5% de prevalencia de anti-HBc. Bello y colaboradores encontraron en pacientes adultos positivos al VIH que la prevalencia de anti-HBc fue 30,4% (Bello *et al.*, 2011), cifra más baja que la anterior, relacionado posiblemente con una menor circulación del VHB en esta población de riesgo y la efectividad de la vacunación. Algo similar reportó Montalvo y colaboradores en el 2007, los cuales encontraron una positividad al anti-HBc total de 50,3% en pacientes hemodializados cubanos. Valdivia y colaboradores 4 años más tarde (2011) observaron la presencia de este marcador en 28,6% en este mismo grupo de personas, sugiriendo que la implementación de las estrategias de prevención del VHB son acertados (Montalvo *et al.*, 2007; Valdivia, 2011).

Al evaluar la distribución del anti-HBc según el sexo, se detectaron cifras de prevalencia muy similares entre ambos sexos, discretamente más elevada en el sexo femenino. Sin embargo, Su y colaboradores en un estudio similar en China evaluó el anti-HBc según sexos, obteniendo prevalencias un poco más elevada en el sexo masculino (53,2 y 46,7% en el sexo masculino y femenino respectivamente) (Su *et al.*, 2013).

En cuanto a la detección de anti-HBc por provincias, las mayores prevalencias en los niños estudiados se detectaron en Matanzas, Cienfuegos y Ciego de Ávila. Si bien no contamos con un estudio en diferentes provincias que sirva de referencia para comparar nuestro hallazgo, Licourt y

colaboradores encontraron en adultos cubanos en el período de 2008-2009, una reactividad general del anti-HBc de 6,8% en cinco provincias de Cuba: Pinar del Río 3,5%, Camagüey 3,8%, Sancti Spíritus 6,7%, Guantánamo 12,6% e Isla de la Juventud 17,6%*. No existe coincidencia entre ambos resultados, probablemente debido a la diferencia de grupos de estudio.

No obstante, existe coincidencia entre el número absoluto de muestras anti-HBc positivas obtenido en el presente estudio y el porcentaje de prevalencia reportado por Licourt y colaboradores respecto a las provincias de Pinar del Río y Guantánamo. Ambas provincias constituyen excepciones en la epidemiología de la Hepatitis B en Cuba, encontrándose porcentajes de prevalencia del HBsAg más elevados que la media nacional (Dra. Licel de los Á Rodríguez y colaboradores. IPK, La Habana, Cuba (comunicación personal, 29 de Abril, 2014).

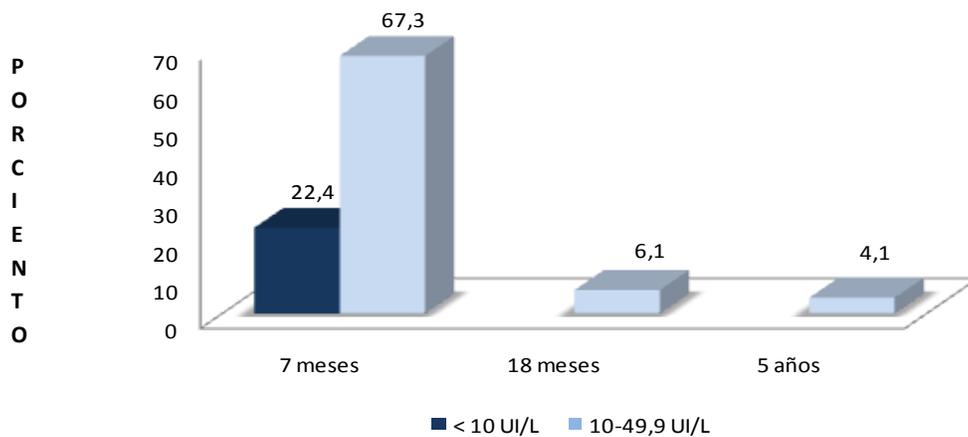
Al comparar los resultados del presente estudio, con las prevalencias de anti-HBc reportada en los trabajos previos de Cuba, evidentemente se hace marcada la diferencia entre los valores. Ello pudiera estar dado por dos razones fundamentales: por un lado se trata de muestras con características demográficas y clínicas diferentes, y por otro lado la diferencia en cuanto a los años de realización del estudio, pues la tendencia de infección por VHB aguda ha marcado una importante disminución en el país desde el 2007 hasta la fecha (MINSAP, 2013), es de esperar entonces que similar tendencia se observe entre estos estudios. Esta disminución puede deberse a

*Licourt y colaboradores Evaluación de nuevos marcadores de la infección de Hepatitis B en bancos de sangre [Presentación en Taller]. En: Taller Nacional de Hepatitis, Ciudad de la Habana, 2008-2009.

las estrategias de vacunación seguidas en nuestro país para la población menor de 34 años que han llevado a la reducción de la morbilidad de la VHB*.

5.2.-Distribución de los anti-HBc (+) según los títulos de anti-HBs, 2007-2012.

De los 49 sueros positivos al anti-HBc se detectaron que 22,4% (11/49) no poseían títulos protectores de anti-HBs (<10 UI/L) y pertenecían al grupo de edad de 7 meses. El resto de las muestras que tenían niveles de anti-HBs entre 10-49,9 UI/L (hiporrespondedores), se comportó como sigue: 67,3% (33/49) niños de 7 meses, 6,1% de 18 meses (3/49) y 4,1% de 5 años (2/49). No se detectaron niños anti-HBc (+) a los 2 y 3 años de edad (Figura 4).



*Delgado G. Situación de la Hepatitis B en Cuba [Presentación en Taller]. En: Taller Nacional de Hepatitis, Ciudad de la Habana, junio, 2008.

Figura 4. Títulos de Anti-HBs en muestras positivas al Anti-HBc (+) según edades.

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012.

Teniendo en cuenta la positividad al anti-HBc, los anti-HBs protectores con títulos entre 10-49,9 UI/L mostraron un porcentaje mayor en los niños de 7 meses (67,3%), igualmente se observó mayor prevalencia de los anti-HBc en esta misma edad, pudiendo deducir que este marcador de exposición pudiera ser de origen materno. Gussetti y colaboradores plantearon que los anti-HBc totales transmitidos pasivamente de la madre al feto desaparecen entre 3 y 7 meses después del nacimiento (Gussetti *et al.*, 1983).

Dupuy y colaboradores, reportaron que de 17 niños nacidos de madres portadoras crónicas del VHB, el 100% poseían al nacer anti-HBc totales en títulos similares al de sus madres y que después del seguimiento de 12 de ellos (entre 6 y 18 meses) solamente 4 negativizaron dichos anticuerpos (Dupuy *et al.*, 1978).

Por otra parte, se encontró que de 6 niños nacidos de madres HBsAg (+), con seguimiento por 12 meses, en 5 (83,3%) los anti-HBc totales no se detectaron (Zamir *et al.*, 1999). Damiani y colaboradores señalaron que los anti-HBc totales se vuelven indetectables a los 18 meses siguientes al parto (Damiani *et al.*, 1989).

Sin embargo, las opiniones al respecto son contradictorias, Gambarin-Gelwan planteó que el anti-HBc transplacentario puede ser detectado en un tercio de recién nacidos a los 12 meses de edad, pero desaparecen antes de los 24 meses (Gambarin-Gelwan, 2007). Se ha señalado también por otros autores que los anti-HBc antes de los 2 años con HBsAg (-), representan simplemente anticuerpos transplacentarios de madres portadoras del VHB y que los anti-HBc aislados,

detectados por encima de los 2 años de edad indica infección pasada (Cabezas-Sánchez y Donayre, 2010).

Así mismo, otros autores han planteado que el 100% de los hijos de madres HBsAg y HBeAg positivas que poseían anti-HBc al nacer, lo pierden durante los 2 años posteriores al nacimiento, excepto en los niños que resultaron HBsAg positivos, quienes mantuvieron títulos durante todo el seguimiento (Poovorawan *et al.*, 1997).

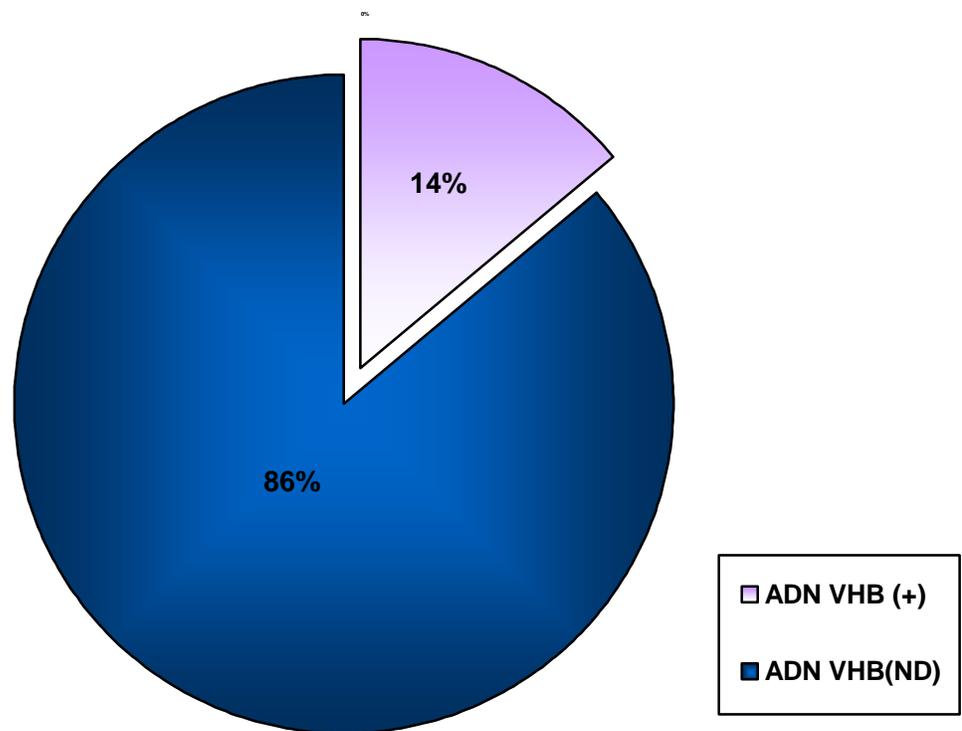
Es importante destacar, que aunque la presencia del anti-HBc, es importante para detectar una IOB, en el 20% de los casos de IOB no hay detección de los marcadores anti-HBc y/o anti-HBs; estos casos se conocen como IOB seronegativos (Ríos-Ocampo *et al.*, 2013).

Podemos concluir que la detección de anti-HBc puede ser de origen materno o producidos por el niño al enfrentarse al VHB, por otra parte, los anti-HBs son producidos por el infante en respuesta a la vacuna o por la IGHB, si los títulos son bajos o no protectores pudiera deberse al consumo de estos anticuerpos por la exposición repetida al VHB que porta la madre positiva, no sucede así en el caso de los hijos de madres HBsAg (-) que tienen títulos de anti-HBs más elevados.

5.3.-Detección del genoma del VHB en hijos de madres positivas al HBsAg en las muestras anti-HBc (+)/anti-HBs <50UI/L.

Después de obtener los resultados relacionados con la presencia de anti-HBc y teniendo en cuenta los niveles de anti-HBs (<50UI/L), parámetros previamente establecidos por la literatura internacional para demostrar la presencia de IOB; se procedió a determinar la presencia del ADN-VHB en 43 sueros, dado que el volumen de las 6 muestras restantes fue insuficiente para realizar la técnica.

Se constató que en 6 muestras de los 43 niños¹ se encontraba presente el genoma del VHB, lo que representa una prevalencia del 14% (6/43), en las muestras que cumplían esta condición (Figura 5). La prevalencia respecto al total de niños nacidos de madres positivas al antígeno del virus resultó en 2,1% (6/291). Los valores de carga viral encontrados fueron bajos y estaban entre $2,15 \times 10^1$ hasta $3,42 \times 10^1$ UI/mL, con un promedio de $2,56 \times 10^1$ UI/mL.



¹49 muestras séricas resultaron positivas al anti-HBc, pero 6 de ellas no fueron suficientes para calcular la carga viral. Por ello, la prevalencia de IOB se calcula en base a 43 muestras de niños.

Figura 5: Detección del genoma del VHB en las muestras anti-HBc (+)/anti-HBs <50UI/L.

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012.

La IOB es una temática muy actual en el contexto de la clínica y la epidemiología de la infección por el VHB. En nuestro país se han realizado investigaciones de IOB en grupos de riesgo como son los pacientes seropositivos al VIH y en pacientes que reciben tratamiento de hemodiálisis (Bello *et al.*, 2011, Valdivia, 2011). El presente estudio se realiza por primera vez en Cuba en muestras de hijos de madres HBsAg (+) que poseen un patrón serológico de ser HBsAg (-) y anti-HBs <50 UI/L.

Estudios realizados en países asiáticos, donde la prevalencia de Hepatitis B es superior a la nuestra, muestran porcentajes de IOB más elevados que lo encontrado en el presente estudio. En Irán, una región con prevalencia de baja a intermedia al HBsAg, encontraron que 21/75 niños de madres HBsAg (+), y con títulos de anti-HBs >10 UI/ml poseían IOB. El 28% de estos infantes a pesar de estar previamente inmunizados con IGHB y con la vacuna anti-Hepatitis B, tenían presencia de ADN. De los niños con IOB, el 24% eran además anti-HBc (+) (Shahmoradi *et al.*, 2012). Nuestros resultados contrastan con este autor en que el 100% de las muestras a las que se les realizó detección de ADN eran anti-HBc positivas, sin embargo, son similares en el sentido que la IOB es más frecuente en niños con títulos de anti-HBs >10 UI/ml.

En un estudio realizado en la India en 222 hijos de madres HBsAg (+), a los cuales se les aplicó vacuna recombinante al nacer y al azar IGHB y placebo, el 64% desarrollo IOB, más común en el grupo con IGHB, esto pudiera deberse a la presencia de cepas atípicas mutadas bajo la presión

inmune que ejerce la IGHB. Este autor concluye que la administración de vacuna conjuntamente con IGHB en nacidos de madres HBsAg (+) no es efectiva para impedir la IOB en estos niños, lo cual puede estar presente hasta un 40% a los 24 meses de edad (Pande *et al.*, 2013).

En nuestro país se aplica la IGHB desde el año 2008, por tanto, se justifica el estudio de IOB en estos niños que reciben tanto IGHB como vacuna, así como el seguimiento serológico y molecular.

En China, Su y colaboradores obtuvieron resultados de IOB en niños de madres portadoras al HBsAg en el 4,9% (9/183) y sus cargas virales se extendieron desde 10^3 a 10^7 UI/mL, de ellos 6 tenían títulos de anti-HBs menores de 100 UI/L. Estos niños recibieron vacunación contra la Hepatitis B (Su *et al.*, 2013). Estos resultados son superiores al encontrado por el presente estudio y puede estar relacionado en que China es un país de elevada prevalencia de HBsAg.

En un estudio realizado en Indonesia, en niños escolares sanos buscando el estado serológico y las características virológicas del VHB, se detectó ADN-VHB en 5 de 222, con marcador HBsAg (-), lo cual sugiere la presencia de IOB en estos casos (Utsumi *et al.*, 2010). Las cepas poseían una mutación en la región del genoma que codifica para el gen S (T126I). Otros autores han encontrado presencia de mutaciones en las cepas relacionadas con la IOB, Shahmoradi y colaboradores en el 2012 encontraron que el 62% de las cepas poseían al menos una mutación en regiones relacionadas con la actividad inmune, de ellas la mutación G145R fue encontrada en 10 niños. La búsqueda de cepas mutantes de escape a la vacuna ha de ser una de las prioridades de los países que utilizan IGHB y vacuna anti-Hepatitis B, con vistas a garantizar una eficaz prevención de esta entidad.

En diferentes niños con riesgo se ha explorado la presencia de IOB. En un estudio de corte transversal realizado en España en niños infectados con VIH se obtuvo que el 2,4% (6/254) de los

casos presentaron IOB (Dapena *et al.*, 2013). En Egipto se evaluó el predominio de IOB en niños y adolescentes con enfermedades hematológicas malignas, de 51 niños y adolescentes estudiados, en 21 de ellos se detectó IOB (Said *et al.*, 2009). Estos resultados avalan que el estudio de IOB se realice en otros niños cubanos de riesgo.

Como plantean otros autores, generalmente la carga viral detectada en los casos de IOB es frecuentemente baja. Shahmoradi y colaboradores en el 2012 mostraron que la carga viral de los casos de IOB tenía un rango entre 77 y $9,24 \times 10^3$ copias/mL, mientras que Ni y colaboradores en Taiwán mostró valores de carga viral de hasta 10^3 copias/mL.

Otras investigaciones son consistentes con estos valores (Shire *et al.*, 2004; Tsui *et al.*, 2007; Lukwaneri *et al.*, 2009). Se ha planteado que el genotipo de VHB circulante en la región de estudio podría estar relacionado con la carga viral encontrada en las IOB (Ni *et al.*, 2012).

Mutaciones en el gen C y su promotor que podrían estar relacionadas con una baja carga viral (<200 UI/mL). El cambio más frecuente es la doble mutación T1762A/A1764G, la cual se ha relacionado con la disminución en la síntesis del ARNpg y como consecuencia disminución en el nivel de síntesis de core y la polimerasa y además menor número de copias molde para la generación de nuevos genomas virales (Parekh *et al.*, 2003).

En cuanto a la presencia de genoma del VHB y los títulos de anti-HBs, se encontró mayor presencia de ADN-VHB en los títulos anti-HBs entre 10-49,9 UI/L (66,7%). Sin embargo, llama la atención que esta cifra fue menor en aquellos que presentaron títulos inferiores a 10UI/L, pues estos se encuentran totalmente expuestos a la posibilidad de infectarse por el VHB (Tabla 6).

Tabla 6. Presencia de ADN del VHB en hijos de madres positivas al HBsAg según títulos de Anti-HBs.

Grupos	ADN-VHB (+)		ADN-VHB (ND)	
	n	%	n	%
Anti-HBs < 10UI/L	2	33,3	7	18,9
Anti- HBs 10- 49,9 UI/L	4	66,7	30	81,1
Total	6	100	37	100

Abreviatura: ND, no detectable

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012.

Aunque el anti-HBs está considerado como el marcador clásico de protección adquirida ya sea, a partir de infección pasada resuelta o mediante la vacunación, en algunos casos sin embargo, se ha detectado ADN viral en pacientes que poseían baja inmunidad contra el HBsAg (Nebbia *et al.*, 2007; Jardim *et al.*, 2008). Esto puede estar relacionado con la infección por mutantes de escape a la vacuna, ya referido anteriormente.

Estudios previos han demostrado que anticuerpos anti-HBs desempeñan una importante función en la protección de individuos infectados por el VHB (Calmus *et al.*, 1994). Investigaciones realizadas en pacientes con IOB han demostrado que los niveles en suero de inmunoglobulina G

(IgG) y el factor C4 del sistema del complemento, son significativamente menores en pacientes con IOB comparado con casos con aclaramiento viral (Arababadi *et al.*, 2012). Así mismo, se ha descrito que pacientes con IOB con anti-HBc detectables en suero tienen una respuesta eficiente de células T de memoria, lo cual se asocia a memoria protectora; mientras que pacientes con IOB negativos para anti-HBc presentan una inadecuada maduración de células T de memoria (Zerbini *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que la respuesta inmune es diferente entre individuos con IOB e individuos que logran el aclaramiento viral. En estudios recientes, se han evaluado los niveles de citoquinas y quimioquinas en pacientes con IOB y se ha demostrado que estos pacientes presentan mayores niveles de interleuquina-10 (IL-10) e IL-17A, comparado con pacientes con resolución de la infección y controles sanos. La IL-10 es considerada una de las principales citoquinas involucradas en la regulación negativa de la respuesta inmune celular contra las infecciones virales, mientras que, la IL-17A inhibe la apoptosis de hepatocitos infectados, por lo que favorece la persistencia del VHB; además la IL-17 tiene un efecto antagonista sobre la IL-12 y la expresión de interferón (INF- γ). Se ha observado que pacientes con IOB no presentan diferencias significativas en la expresión de IL-12 comparado con individuos sanos y con infección resuelta, por el contrario los niveles de IL-10, IL-17 e INF- γ son reducidos (Arababadi *et al.*, 2010; Arababadi *et al.*, 2012). Factores genéticos relacionados con el hospedero podrían interferir con la expresión de citoquinas, por lo que se podrían correlacionar con la falta del aclaramiento viral en la IOB.

En nuestro estudio la prevalencia de IOB fue de 2,1% en un total de 6 casos de niños anti-HBc positivos y carga viral detectable. El número de infecciones ocultas es similar en ambos sexos, con porcentajes de 2,3 y 1,9 en los sexos masculino y femenino respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Prevalencia de Infección oculta por el VHB en hijos de madres positivas al HBsAg según sexos.

	IOB	Prevalencia
Sexo masculino n=132	3	2,3%
Sexo femenino n=159	3	1,9%
Total n=291	6	2,1%

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012.

En la Hepatitis B abierta (con marcador HBsAg positivo), las personas del sexo masculino tienen más probabilidades de hacerse portadores crónicos del VHB que el femenino (Li *et al.*, 2012). Existen pocos reportes en la literatura que relacionen la prevalencia de IOB según sexos en la edad pediátrica, Shahmoradi y colaboradores (2012) encontraron que de 21 niños hijos de madres HBsAg positivas con IOB, el 57,1% eran del sexo masculino. Sin embargo, de 5 escolares con IOB en Indonesia, el 80% eran del sexo femenino (Utsumi *et al.*, 2010).

En la población adulta, un estudio en Colombia en pacientes seropositivos al VIH encontró IOB en un paciente masculino (Polo *et al.*, 2010), en tanto que en Egipto el 100% de los adultos con infección dual (IOB y VHC) eran del sexo masculino (Emara *et al.*, 2010). En una investigación

buscando IOB en pacientes de alto riesgo (seropositivos al VIH y hemodializados), el 62,5% de los mismos eran del sexo masculino (Hamkar *et al.*, 2010).

5.4.-Relación entre la presencia de infección oculta con algunas variables sociodemográficas.

En los niños seleccionados para detectar IOB se analizaron variables que permitieron caracterizarlos demográficamente (Tabla 8). A pesar de no existir asociación significativa entre la IOB y las variables sociodemográficas seleccionadas, se identificó mayor riesgo de adquirir una IOB en el sexo masculino (RP=1,52 (IC 95%: 0,34-6,71)).

Al analizar los niveles de anti-HBs, se demostró que los niños estudiados, con anti-HBs <10 UI/L tuvieron 1,88 (IC 95%: 0,4-8,72) veces mayor probabilidad de tener IOB que el resto de los casos con títulos superiores. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la IOB es frecuente en las muestras con bajos niveles de seroprotección anti-HBs (<10 UI/L).

Es importante resaltar, que en ninguna de las correlaciones realizadas se encontraron diferencias estadísticamente significativas, lo cual se corresponde plenamente con lo reportado por otros estudios nacionales y foráneos (Mina *et al.*, 2010; Bello *et al.*, 2011; Valdivia, 2011; Shahmoradi *et al.*, 2012), y que podría deberse a la intencionalidad selectiva de las muestras.

Tabla 8. Positividad al ADN-VHB en hijos de madres positivas al HBsAg según variables sociodemográficas y anti-HBs.

Variables	ADN/ VHB (+) / %	n	RP (IC 95%)
Sexo			
Masculino	3(17,6)	17	1,52 (0,34-6,71)
Femenino	3(11,5)	26	
Anti-HBs (UI/L)			
< 10 UI/L	2 (22,2)	9	1,88 (0,4-8,72)
10-49,9 UI/L	4 (11,8)	34	

Fuente de datos: Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales. IPK/2007-2012

Su y colaboradores no encontraron diferencias estadísticamente significativas en la edad o sexo entre los infantes con IOB con los que no lo presentaban. Tampoco encontraron diferencias en otros factores tales como: dosis de vacuna anti-Hepatitis B, anti-HBs, anti-HBc y seroconversión a HBeAg de la madre. Un factor que se ha asociado a la presencia de IOB en niños en zonas de

elevada prevalencia de HBsAg es la carga viral materna, la cual se considera como el mayor factor de riesgo para la infección ya sea abierta u oculta por el VHB (Su *et al.*, 2013).

En diferentes grupos de riesgo en adultos en la literatura internacional se ha demostrado relación con la IOB. En estudio realizados en Canadá no se encontró asociación alguna entre la IOB y variables sociodemográficas como el sexo y el color de la piel (Minuk *et al.*, 2004). En Turquía, un grupo de investigadores demostró que además de el sexo, el tiempo de diálisis y la infección por el VHC, no guardaban relación significativa con este tipo de enfermedad (Yakaryilmaz *et al.*, 2006), asimismo en otra observación tampoco se halló evidencia de que la IOB dependiera de alguna de estas variables (Kanbay *et al.*, 2006). En Italia, una investigación acerca de la IOB plantea que ésta no está vinculada estadísticamente al tiempo de diálisis o a alguna variable sociodemográficas en los pacientes HD (Fabrizi *et al.*, 2008).

La IOB está considerada hoy en día como una infección emergente, su génesis es multifactorial, donde intervienen factores del virus y del huésped. Los mecanismos de patogénesis de la IOB propuestos incluyen: i) variabilidad genética del VHB, ii) integración del genoma viral al genoma celular, iii) regulación transcripcional del minicromosoma por mecanismos epigenéticos, iv) respuesta inmune del hospedero, y v) coinfecciones por el VIH y el VHC (Rios Ocampo *et al.*, 2013).

Factores virales como las mutaciones en el gen C pueden llevar a modificaciones antigénicas y alteraciones en el nivel de síntesis de las proteínas del VHB y del ARNpg; esto se podría asociar con la no detección de antígenos virales mediante las técnicas diagnosticas. También mutaciones en la región pre-S1 pueden disminuir el nivel de expresión del HBsAg y por tanto afectar la

formación de nuevas partículas virales; esta secuencia contiene un elemento regulador (Promotor preS1), el cual estimula la síntesis del ARN subgenómico de 2.4 kb (Ni *et al.*, 2012; Chisari *et al.*, 1987).

Otro de los mecanismos que podría estar implicado con la OBI, es la integración del genoma del VHB en el genoma celular; la integración del genoma viral puede resultar en la pérdida de la expresión de antígenos virales como el HBsAg, reducción en la producción de nuevos viriones y disminución de la carga viral (Raimondo, 2007).

Se ha sugerido que la respuesta inmune humoral y celular es diferente entre individuos con OBI e individuos que logran el aclaramiento viral. Este tema es de especial importancia ya que muchos de los grupos de riesgo estudiados buscando IOB poseen alteraciones de la respuesta inmune por su enfermedad o condición de base (VIH, Hemodializados, hemofílicos, drogadictos, entre otros).

Es importante considerar en la génesis de la IOB, la llamada interferencia viral, como un factor que influencia negativamente la replicación del VHB y la expresión del gen. Esto se ha observado en la coinfección con otros virus, como es el caso de la coinfección con el VHC (Vildózola y Salinas, 2009). Sin embargo, es importante comentar que en este estudio no se le realizó a los sueros anticuerpos al VHC y VIH por lo que no podemos descartar que algunas de estas variables hayan influido en los resultados de este trabajo (Bello *et al.*, 2010).

Por otro lado, la relevancia clínica de la IOB radica en el impacto en diferentes situaciones como la posibilidad de transmisión de esta infección, la reactivación, el efecto que pudiera tener en pacientes con enfermedad hepática crónica y la probabilidad de relacionarse con el carcinoma hepatocelular.

Para finalizar, según los datos aportados por la presente investigación sugerimos que el seguimiento de los hijos de madres HBsAg (+), debe incluir aquellos que sean positivos al anti-HBc total en ausencia de HBsAg, buscando IOB y posteriormente las mutantes de escape que puedan existir a pesar de la inmunización pasiva-activa. Esta estrategia de diagnóstico contribuirá a prevenir o disminuir el riesgo de infección, la presencia de secuelas y la transmisión del VHB en este grupo de riesgo. Investigaciones futuras deberán realizarse para verificar la presencia de otros mecanismos involucrados en la patogénesis de la IOB.

VI.-CONCLUSIONES

- 1.- La prevalencia del marcador de exposición al VHB es intermedia, predominando en el sexo femenino.
- 2.- Se identifica una mayor exposición al VHB en las provincias Pinar del Rio, La Habana y Guantánamo.
- 3.- Los anti-HBc en la muestra estudiada en su mayoría son de origen materno, ya que el mismo predominó en los niños de 7 meses de edad con bajos títulos de anti-HBs.
- 4.- Se identifica que la mayor probabilidad de tener IOB es para los niños del sexo masculino y con títulos no protectores de anti-HBs.
- 5.- Se detecta IOB en los hijos de madres positivas al HBsAg estudiados, lo que demuestra que a pesar de la vacunación tienen riesgo de contraer la infección por el VHB.

VII.-RECOMENDACIONES

1. Informar al MINSAP los resultados obtenidos en el estudio con vista a evaluar y perfeccionar las estrategias de control y prevención de la IOB por consulta especializada de Gastroenterología pediátrica.
2. Realizar anti-HBc a los hijos de madres HBsAg (+) que sean HBsAg (-) y que tengan anti-HBs menor de 50 UI/L, buscando IOB, factor importante para la futura eliminación en Cuba de la Hepatitis B.
3. Dar seguimiento de las muestras con ADN-VHB a través de futuros estudios de secuenciación que permitirán identificar genotipos y subtipos circulantes en el país, así como variantes moleculares que escapen de la vacunación contra el virus.

VIII. - BIBLIOGRAFIA

- Aggarwal R, Ranjan P. Preventing and treating Hepatitis B infection. *BMJ*. 2004;329:1080-6.
- Aghakhani A, Banifazl M, Kalantar E, Eslamifar A, Ahmadi F, Razeghi E, et al. Occult Hepatitis B virus infection in hemodialysis patients with isolated Hepatitis B core antibody: a multicenter study. *Ther Apher Dial*. 2010;14(3):349-53.
- Alfonso OL, del Rosario M. Hepatitis B: Una problemática mundial. *Rev Cubana Med*. 2003. [Internet]. [citado 2013 Oct 26];42(4): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75232003000400008&lng=es.
- Alper CA, Kruskall M, Marcus-Bagley D, Craven DE, Katz AJ, Brink SJ, et al. Genetic prediction of no response to Hepatitis B vaccine. *N Engl J Med*. 1989;321:708-12.
- Arababadi MK. Serum Levels of IL-10 and IL-17A in Occult HBV-Infected South-East Iranian Patients. *Hepat Mon*. 2010;10(1):31-5.
- Arababadi MK, Ahmadabadi BN, Kennedy D. Current information on the immunologic status of occult hepatitis B infection. *Transfusion*. 2012;52(8):1819-26.
- Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):48-64.
- Bello M, Díaz M, Hung LH, Delgado G, Montalvo MC, Sario S, et al. Marcadores serológicos en lactantes de alto y bajo riesgo de infección por el virus de la Hepatitis B inmunizados con una vacuna recombinante cubana. *Rev Pediátrica*. 2006;8(1):7-14.
- Bello M, Montalvo MC, Rodríguez L, Sario S, Verdasquera D, Vincent M, et al. Occult Hepatitis B in Cuban HIV patients. *Medicc Review*. 2011;13(2):32-7.
- Bello M, Rodríguez L, Montalvo MC, Sario S, González I, Baly A et al. Marcadores virales de las hepatitis B y C en niños con VIH. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 2010;23(91):80-6.
- Bello M, Rodríguez L, Nazco M, Montalvo MC, Sario S, Verdasquera D, et al. Evaluación serológica de la inmunización pasiva-activa en la profilaxis de la transmisión perinatal de la Hepatitis B. *VacciMonitor*. 2012;21(2):24-30.
- Beltrán M, Arbeláez MP, Donando J, Jaramillo S, de la Hoz F, Estrada C, et al. Seroprevalencia de infección por virus de la Hepatitis B y por virus de la inmunodeficiencia humana en una población de pacientes con múltiples transfusiones en cuatro hospitales, Colombia, Sur América. *Biomédica*. 2009;29:232-43.
- Beltrán M, Berrío-Pérez M, Bermúdez MI, Rey-Benito G, Camacho B, Forero P, et al. Detección de Hepatitis B oculta en donantes de bancos sangre, Colombia 2008-2009. *Biomédica*. 2011;31:580-9.

- Cabezas-Sánchez C, Donayre F. Gestación e infección por el Virus de Hepatitis B. *Rev Per Ginecol Obstet.* 2010;183-92.
- Calmus Y. Distribution of hepatitis B virus DNA sequences in different peripheral blood mononuclear cell subsets in HBs antigen-positive and negative patients. *Eur J Clin Invest.* 1994;24(8):548-52.
- Chakvetadze C, Roussin C, Roux J, Mallet V, Petinelli ME, Pol S. Efficacy of Hepatitis B sero-vaccination in newborns of African HBsAg positive mothers. *Vaccine.* 2011;29(16):2846-9.
- Chen X, Chen J, Wen J, Xu C, Zhang S, Zhou YH, et al. Breastfeeding is not a risk factor for mother-to-child transmission of Hepatitis B virus. *PLoS One* [Internet]. 2013 [citado 4 Mar 2014];8(1):[aprox. 13p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC23383145/>.
- Chisari FV. Structural and pathological effects of synthesis of hepatitis B virus large envelope polypeptide in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987;84(19):6909-13.
- Cirión GR, Herrera MA, del Valle M, Quintero W, Lores C. Diagnóstico histológico de la hepatitis viral crónica B. *Rev Ciencias Médicas* [Internet]. 2010 [citado 2013 Oct 25]; 14(4):3-16. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-31942010000400002&lng=es.
- Cooksley WG. Do we need to determine viral genotype in treating chronic hepatitis B? *J Viral Hepat.* 2010;17(9):601-10.
- Coopstead D, Lee-Ellen C. *Pathophysiology.* Missouri: Saunders; 2010 .p.886-7.
- Damiani S, Attanassio P, Maneschi F, Speciale P, La Ferla A, Navvett A. Maternal-fetal transmission of infection with Hepatitis B Virus: evaluation of viral markers in maternal and fetal biological materials and relationship with the vaccine response. *Ann Ostet Ginecol Med Perinat.* 1989;110:217-25.
- Dane DS, Cameron CH, Briggs M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet.* 1970;1(7649):695-8.
- Dapena M, Figueras C, Noguera-Julian A, Fortuny C, de José MI, Mellado MJ, et al. Implementation of occult hepatitis screening in the Spanish cohort of HIV-infected pediatric patients. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(9):377-9.
- de la Hoz F, Pérez L, de Neira M, Hall AJ. Eight years of Hepatitis B vaccination in Colombia with a recombinant vaccine: Factors influencing Hepatitis B virus infection and effectiveness. *Int J Infect Dis.* 2008;12:183-9.

- Devesa M, Loureiro CL, Rivas Y, Monsalve F, Cardona N, Duarte MC, et al. Subgenotype diversity of Hepatitis B virus American genotype F in Amerindians from Venezuela and the general population of Colombia. *J Med Virol*. 2008;80:20-6.
- Dupuy JM, Giraud MD, Dupuy C, Hoofnagle MD. Hepatitis B in children. II. Study of children born to chronic HBsAg carrier mothers. *J Pediatr*. 1978;92:2004.
- Emara MH, El-Gamma NE, Lamiaa MA, Bahgat MM. Occult Hepatitis B Infection in Egyptian Chronic Hepatitis C patients: Prevalence, impact on Pegylated Interferon/Ribavirin therapy. *Virology Journal*. 2010;7:32420.
- Espinoza-Holguín M, Arteaga-Vizcaíno M, Porto L, Montilva R, Atencio R, Callejas D, et al. Hepatitis B en niños con cáncer. *Rev Gastroenterol Perú*. 2006;26:259-64.
- European Association for the Study of the Liver (EASL). Clinical Practice Guidelines: Management of chronic Hepatitis B. *J Hepatol*. 2009;50:227-42.
- Fabrizi F, Marzano A, Messa P, Martin P, Lampertico P. Hepatitis B virus infection in the dialysis population: current perspectives. *Int J Artif Organs*. 2008;31(5):386-94.
- Ferir G, Kaptein S, Neyts J, de Clercq E. Antiviral treatment of chronic hepatitis B virus infections: The past, the present and the future. *Rev Med Virol*. 2008;18:19-34.
- Galoppo MC. Hepatitis B. Historia Natural y manejo del niño portador asintomático. *Revista Gastrohnutr*. 2010;12(2):74-6.
- Gambarin-Gelwan M. Hepatitis B in pregnancy. *Clin Liver Dis*. 2007;11:945-63.
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B Virus Infection-Natural History and Clinical Consequences. *N Engl J Med*. 2004;350:1118-29.
- Gerlich W, Bremer C, Saniewski M, Schuttler CG, Wend U, Wilems WR, et al . Occult Hepatitis B virus infection: detection and significance. *Dig Dis Sci*. 2010;28:116-25.
- Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I, Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology, risk factors and pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2008;14(27):4300-8.
- Gonzalez S, Keeffe E. Chronic Hepatitis B and C: Update on Therapy. *Future Virology*. 2009;4(5):437-52.
- Gussetti N, Pornazo E, Largajolli G, D'Elia R. Vertical transmisión of HBV from mothers HBsAg positive, anti-HBe positive. *Dev Biol Stand*. 1983;54:405-8.
- Gutiérrez C, León G, Liprandi F, Pujol FH. Low impact of silent Hepatitis B virus infection on the incidence of post-transfusion hepatitis in Venezuela. *Rev Panam Salud Pública*. 2001;10(6):382-7.

- Hamdani-Belghiti S, Bouzzaou NL. Mother-child transmission of Hepatitis B Virus. State of the problem and prevention. *Arch Pediat*. 2000;7(8):879-82.
- Hamkar R, Aghakhanib A, Soufianc S, Banifazld M, Ghavamia N, Nadria M, et al. Surface gene mutations of hepatitis B virus among high-risk patients with occult hepatitis B virus infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2010;66:285-291.
- Hill JB, Sheffield JS, Kim MJ, Alexander MJ, Sercely B, Wendel GD. Risk of hepatitis B transmission in breast-fed infants of chronic hepatitis B carriers. *Obstet Gynecol*. 2002;99:1049-52.
- Hollinger FB. Hepatitis B virus. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editores. *Fields Virology*. 4th Edition. Lippincott-Raven Publisher. Philadelphia; 2007. p.2739-2807.
- Hollinger FB and Sood G. Occult hepatitis B virus infection: a covert operation. *J Viral Hepat*. 2010;17:1-15.
- Hoofnagle JH, Doo E, Liang TJ. Management of Hepatitis B: summary of a clinical research workshop. *Hepatology*. 2007;45:1056-75.
- Hui CK, Leung N, Yuen ST. Natural history and disease progression in Chinese chronic Hepatitis B patients in immune-tolerant phase. *Hepatology*. 2007;46:395-401.
- Jauma AJ, Insua C, Macías AC, González C, Bericiartu M. Respuesta inmune-celular y humoral en niños inmunodeprimidos vacunados con la vacuna cubana anti-Hepatitis B. *Rev Haban Cienc Méd* [Internet]. 2009 Jun [citado 18 May 2010];8(2):[aprox.4p.]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2009000200015&lng=es.
- Jardim, RN, Gonzales NS, Pereira JS, Fais VC, Gonzales J. Occult hepatitis B virus infection in immunocompromised patients. *Braz J Infect Dis*. 2008;12(4),300-05.
- Kanbay M, Gur G, Akcay A, Selcuk H, Yilmaz U, Arslan H, et al. Is hepatitis C virus positivity a contributing factor to occult hepatitis B virus infection in hemodialysis patients? *Dig Dis Sci*. 2006;51(11):1962-6.
- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *JAMA*. 1967;200:365-73.
- Lai M, Hyatt BJ, Nasser I. The clinical significance of persistently normal ALT in chronic Hepatitis B infection. *J Hepatol*. 2007;47:760-7.
- Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004;1:97-107.
- Lavanchy D. Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol*. 2005;34:1-3.

- Lee CP, Zenios SA, Chertow GM. Cost-effectiveness of frequent in center hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(9):1792-7.
- Li X, Zheng Y, Liau A, Cai B, Ye D, Huang F, et al. Hepatitis B virus infections and risk factors among the general population in Anhui Province, China: an epidemiological study. *BMC Public Health.* 2012;12:272.
- Liaw YF, Chu CM. Hepatitis B virus Infection. *Lancet.* 2009;373(9663):582-92.
- Liaw YF, Leung N, Kao JH. Asian-Pacific consensus statement on the management of chronic Hepatitis B: a 2008 update. *Hepatol Int.* 2008;2:263-83.
- Liu CJ, Kao JH. Hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: epidemiology and pathogenic role of viral factors. *J Chin Med Assoc.* 2007;70:141-5.
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic Hepatitis B. *Hepatology.* 2007;45:507-39.
- Lukhwareni A, Burnett RJ, Selabe SG, Mzileni MO, Mphahlele MJ. Increased detection of HBV DNA in HBsAg-positive and HBsAg-negative South African HIV/AIDS patients enrolling for highly active antiretroviral therapy at a Tertiary Hospital. *J Med Virol.* 2009;81(3):406-12.
- MacCallum FO. Homologous serum jaundice. *Lancet.* 1947;2:691-2.
- Magnus LO, Espmark JA. Specificities in Australia antigen positive sera distinct from the LeBowvier determinants. *J Immunol.* 1972;109:1017-21.
- Mast E, Mahoney F, Kane M, Margolis H. Hepatitis B. En: Plotkin SA, Orenstein WA (editors), *Vaccines*, 4th edition. Philadelphia: W.B. Saunders, Co.; 2004. p. 299-328.
- Mauss S. Therapy of chronic hepatitis B: new goals and new treatments. *Minerva Med.* 2009;100(6):447-58.
- McGovern BH. The epidemiology natural history and prevention of Hepatitis B: implications of HIV coinfection. *Antivir Ther.* 2007;12(3):3-13.
- MINSAP. Anuario Estadístico en Salud, 2012. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud 2013. ISSN:156 - 4425.
- Mina P, Georgiadou SP, Rizos CH, Dalekos GN, Rigopoulou EI. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in haemodialysis patients from central Greece. *World J Gastroenterol.* 2010;16(2):225-231.
- Minuk GY, Sun DF, Greenberg R, Zhang M, Hawkins K, Uhanova J, et al. Occult Hepatitis B virus infection in a North American adult hemodialysis patients population. *Hepatology.* 2004;40(5):1072-7.
- Monsalve-Castillo F, Echevarría JM, Atencio R, Suárez A, Estévez J, Costa-León L, et al. High prevalence of Hepatitis B infection in Amerindians in Japreira, Zulia State, Venezuela. *Cad Saúde Pública.* 2008;24:1183-6.

- Montalvo MC, Delgado G, Díaz M, Rodríguez L. Prevalence of hepatitis B virus markers and risk factors associated in haemodialysis patients from Havana City; 2002-2003. *Nefrología*. 2007;27(2):234-5.
- Morgan M, Park W, Keeffe EB. Diagnosis and treatment of chronic Hepatitis B: an update. *Minerva Gastroenterol Dietol*. 2007;53(1):25-41.
- Murray R. Viral hepatitis. *Bull NY Acad Med*. 1955;31:341-58.
- Muzio V, Pentón E. El Virus de la Hepatitis B. En: Padrón GJ, editor. Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales. La Habana: *Elfos Scientiae*;1998. p.119-160.
- Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res*. 2008;134(1):235-249.
- Nebbia G, Garcia-Diaz A, Ayliffe U, Smith C, Dervisevic S, Johnson M, et al. Predictors and kinetics of occult Hepatitis B virus infection in HIV infected persons. *J Med Virol*. 2007;79(10):1464-71.
- Ni HY, Chang HM, Wu JF, Hsu HY, Chen HL, Chen DS. Minimization of hepatitis B infection by a 25-year universal vaccination program. *Journal Hepatology*. 2012;57:730-5.
- Paat G, Uusküla A, Tefanova V, Tallo T, Priimägi L, Ahi K. The trends and risk factors for Hepatitis B occurrence in Estonia. *Cent Eur J Public Health* 2009. [serie en internet]. [citado 2013 Oct 25]; 17(2): [aprox. 4p.]. Disponible en:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19662830>.
- Pande C, Sarin SK, Patra S, Kumar A, Mishra S, Srivastava S, et al. Hepatitis B vaccination with or without Hepatitis B immunoglobulin at birth to babies born of HBsAg-positive mothers prevents overt HBV transmission but may not prevent occult HBV infection in babies: a randomized controlled trial. *J Viral Hepat*. 2013;20(11):801-10.
- Panduro A, Escobedo G, Fierro NA, Ruiz B, Zepeda-Carrillo EA, Román R. Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud Pública Méx*. 2011;53 suppl.1, <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342011000700008>.
- Panigrahi R, Biswas A, Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Mahapatra PK, et al. Anti-hepatitis B core antigen testing with detection and characterization of occult hepatitis B virus by an in-house nucleic acid testing among blood donors in Behrampur, Ganjam, Orissa in southeastern India: implications for transfusion. *Virology Journal*. 2010;7:204.
- Parekh S. Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants. *J Virol*. 2003;77(12):6601-12.
- Pedroso P, Díaz M, Rodríguez L. Eficacia protectora de la vacuna Heberbiovac HB® a diferentes dosis en niños impedidos físicos y mentales. *Rev Cubana Med Trop* [revista en la Internet]. 2010 Abr [citado 2013 Oct 24];62(1):82-92. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602010000100009&lng=es.

- Pol S. Natural history of Hepatitis B infection. *Presse Med.* 2006;35:308-16.
- Polo P, Castañeda C, Sierra M, Alvis N. Hepatitis B oculta en pacientes VIH positivos de una institución de salud en Barranquilla Colombia. *Infect.* 2010;14(1):39-46.
- Poovorawan Y, Sanpavat S, Chumderpadetsuk S, Safary A. Long term Hepatitis B vaccine in infants born to Hepatitis B e antigen positive mothers. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 1997;77:47-51.
- Previsani N, Lavanchy D. Hepatitis B. World Health Organization. 2002. [citado: 12 de agosto de 2002]. Disponible en: <http://www.who.int/enmc>.
- Pungpapong S, Ray KW, Poterucha J. Natural History of Hepatitis B Virus Infection: An Update for Clinicians. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(8):967-75.
- Raices M. NASVAC: a therapeutic vaccine with potentialities to improve the quality of life of chronic Hepatitis B patients. *Biotechnol Apl* [revista en la Internet]. 2011 Sep [citado 2013 Oct 24];28(3):168-69. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-28522011000300007&lng=es.
- Raimondo G, Pollicino T, Cacciola I, Squadrito G. Occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007;46:160-70.
- Raimondo G, Navarra G, Mondello S, Costantino L, Colloredo G, Cucinotta E, et al. Occult hepatitis B virus in liver tissue of individuals without hepatic disease. *J Hepatol.* 2008;48:743-6.
- Raimondo G, Pollicino T, Romano L, Zanetti AR. A 2010 update on occult Hepatitis B infection. *Pathol Biol (Paris).* 2010;58(4):254-7.
- Ramia S, Mokhbat J, Ramlawi F, El-Zaatari M. Occult Hepatitis B virus infection in HIV-infected Lebanese patients with isolated antibodies to Hepatitis B core antigen. *Int J STD AIDS.* 2008;19(3):197-9.
- Ramírez-Soto MC, Huichi-Atamari M, Aguilar-Ancori EG, Pezo-Ochoa JD. Seroprevalencia de hepatitis viral B en estudiantes universitarios en Abancay, Perú. *Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.* 2011;28(3):513-7.
- Ríos-Ocampo A, Restrepo J, Cortés F, Correa G, Navas MC. Infección oculta por el virus de la Hepatitis B. Aspectos clínicos epidemiológicos y moleculares. *Acta Med Colomb.* 2013 [serie en la Internet]. July [citado el 7 de Nov del 2013];38(3):143-153. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-24482013000300010&lng=en.

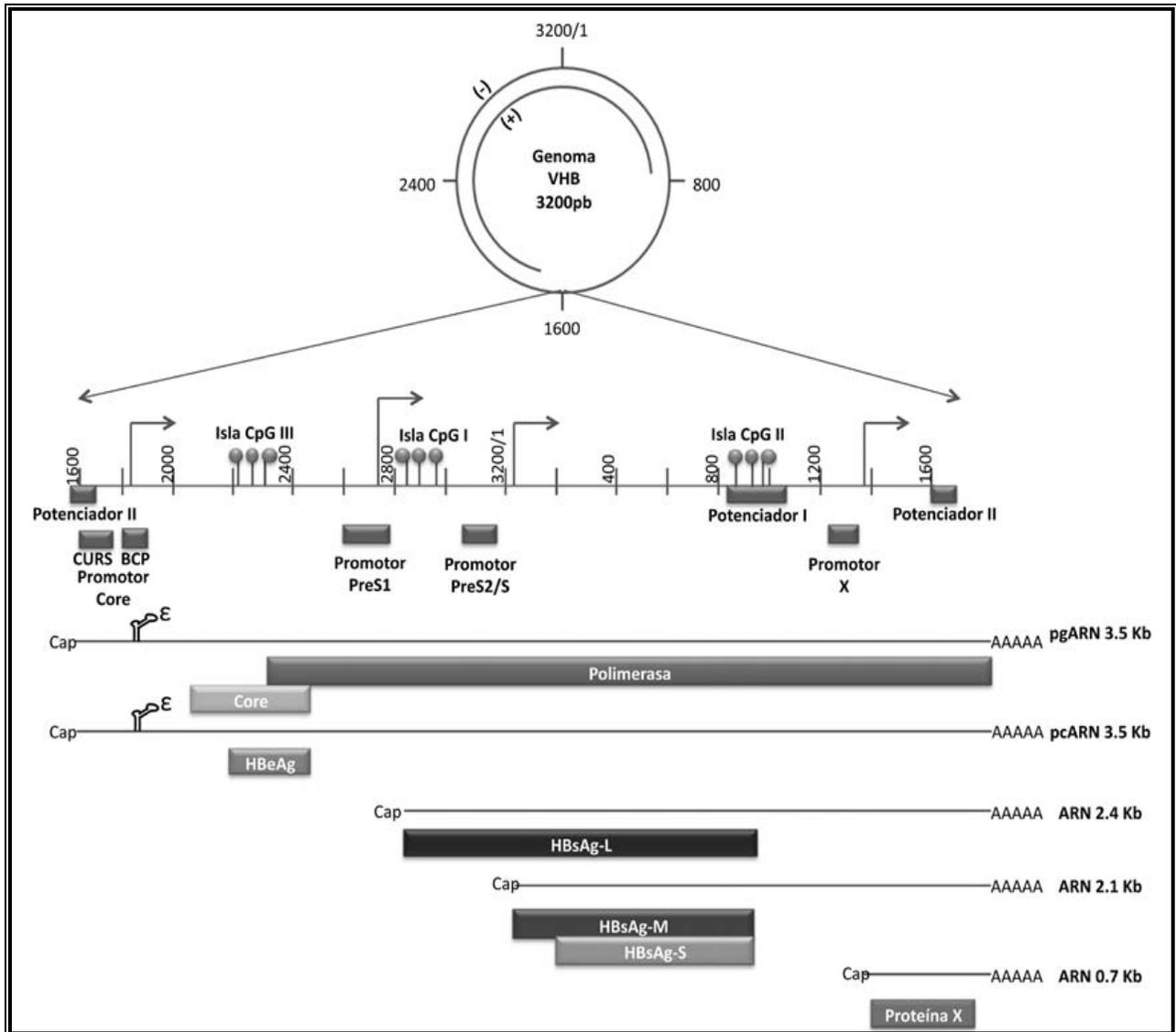
- Rodríguez L, Collado F, Aragón U, Díaz B, Rivero J. Hepatitis B Virus exposure in Human Immunodeficiency Virus seropositive Cuban patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95(2):243-5.
- Said ZN, El-Sayed MH, El-Bishbishi IA, El-Fouhil DF, Abdel-Rheem SE, El-Abedin MZ, et al. High prevalence of occult Hepatitis B in hepatitis C-infected Egyptian children with haematological disorders and malignancies. *Liver Int* [Internet]. 2009 Abr [citado 4 Mar 2014];29(4):[aprox. 13p.]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1478-3231.2009.01975.x/full>.
- Sariego, S. Perfil Seroepidemiológico de los virus de las Hepatitis B y C en niños de alto riesgo. [Tesis para optar por el grado de Master en Ciencias]. 2008. La Habana: “Instituto de Medicina Tropical P. Kourí”.
- Seeger C, Mason WS. Hepatitis B virus Biology. *Microbiology and Molecular Review* 2000;64:51-68.
- Shahmoradi S, Yahyapour Y, Mahmoodi M, Alavian SM, Fazeli Z, Jazayeri SM. High prevalence of occult Hepatitis B virus infection in children born to HBsAg-positive mothers despite prophylaxis with Hepatitis B vaccination and HBIG. *Journal of Hepatology*. 2012;57:515-21.
- Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: Epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev*. 2006;28:112-25.
- Shi CR, Zhuang H. *Occult HBV. Infect Dis Inf (Chin)*. 2005;18:97-9.
- Shi Z, Yang Y, Wang H, Ma L, Schreiber A, Li X, et al. Breastfeeding of Newborns by Mothers Carrying Hepatitis B Virus: A Meta-analysis and Systematic Review. *Archives of Pediatrics and Adolescent Medicine*. 2011;165(9):837-46.
- Shire NJ, Rouster SD, Rajicic N, Sherman KE. Occult Hepatitis B in HIV-infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;36(3):869-75.
- Sirma H, Funk A, Gerlich W, Schildgen O. Does pre-treatment with lamivudine prime for adefovir resistance of Hepatitis B virus infection? *J Antimicrob Chemother*. 2007;60(2):448-9.
- Su H, Zhang Y, Xu D, Wang B, Zhang L, Li D, et al. Occult Hepatitis B Virus Infection in Anti-HBs-Positive Infants Born to HBsAg-Positive Mothers in China. *PLoS ONE*. 2013;8(8): e70768.
- Tatematsu K, Tanaka Y, Kurbanov F. A genetic variant of hepatitis B virus divergent from known human and ape genotypes isolated from a Japanese patient and provisionally assigned to new genotype J. *J Virol*. 2009;83:10538-47.

- Thedja MD, Roni M, Harahap AR, Siregar NC, Le SI, Muljono DH. Occult Hepatitis B in blood donors in Indonesia: altered antigenicity of the Hepatitis B virus surface protein. *Hepatol Int*. 2010;4(3):608-14.
- Tillmann HL. Antiviral therapy and resistance with Hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2007;13(1):125-40.
- Torbenson M, Thomas DL. Occult Hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis*. 2002;2(8):479-86.
- Tsui J. Prevalence and long-term effects of occult Hepatitis B virus infection in HIV-infected women. *Clin Infect Dis*. 2007;45(6):736-40.
- Utsumi T, Yano Y, Lusida MI, Amin M, Soetjipto, Hotta H, et al. Serologic and molecular characteristics of Hepatitis B virus among school children in East Java, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2010 Jul [citado 4 Mar 2014];83(1):[aprox.14p.] Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC20595500/>.
- Valdivia EE. Infección oculta por el Virus de la Hepatitis B en pacientes hemodializados cubanos. [Tesis para optar por el título de Licenciado en Biología]. 2011. La Habana, Cuba.
- Vildózola H, Salinas JL. Historia Natural de la Infección Crónica por el Virus Hepatitis B. *Rev Gastroenterol Perú*. 2009;29-2:147-157
- Volz S, Schildgen O, Muller A, Tillmann RL, Eis-Hubinger AM, Kupfer B, et al. The human bocavirus: pathogen in airway infections? *Dtsch Med Wochenschr*. 2007;32(28-29):1529-33.
- Wasley A, Grytdal S, Gallagher K. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for acute viral hepatitis--United States, 2006. *MMWR Surveill Summ*. 2008;57(2):1-24.
- Xu WM, Cui YT, Wang L, Yang H, Liang ZQ, Li XM, et al. Lamivudine in late pregnancy to prevent perinatal transmission of Hepatitis B virus infection: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Viral Hepatol*. 2009;16:94-103.
- Yakaryilmaz F, Gurbuz OA, Guliter S, Mert A, Songur Y, Karakan T, et al. Prevalence of occult hepatitis B and hepatitis C virus infections in Turkish hemodialysis patients. *Ren Fail*. 2006;28(8):729-35.
- Yuen, MF, Yuan HJ, Wong DK. Prognostic determinants for chronic Hepatitis B in Asians: therapeutic implications. *Gut*. 2005;54:1610-4.
- Zamir C, Dagan R, Zamir D, Rishpon S, Fraser D, Rimon N, et al. Evaluation of screening for Hepatitis B surface antigen during pregnancy in a population with a high prevalence of Hepatitis B surface antigen-positive/Hepatitis B e antigen-negative carriers. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18(3):262-6.

- Zerbini A. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2008;134(5):1470-81.
- Zubieta M, Santolaya ME, Hurtado C, Alvarez AM, Avilés CL, Becker A, et al. Seroprevalencia de virus Hepatitis B en niños con cáncer en tratamiento quimioterápico en 6 hospitales de Santiago de Chile. *Rev Méd Chile* [Internet]. 2009 Jul [citado 7 Feb 2014];137(7):[aprox. 9p.]. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872009000700007&lng=es.

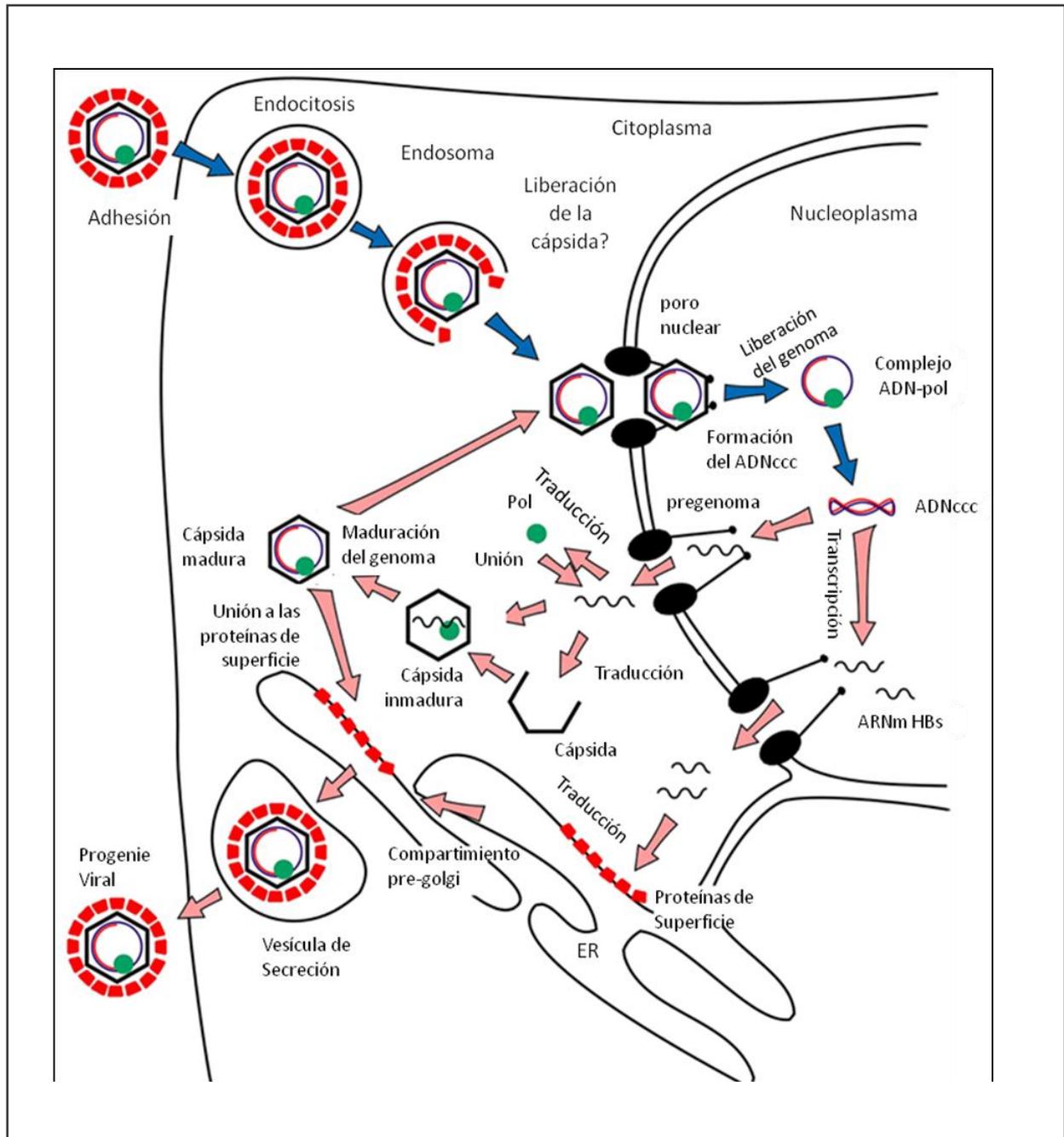
IX.-ANEXOS

Anexo 1: Organización genómica del VHB



Anexo 1. Organización genómica del VHB. El crADN del VHB se representa con un círculo de 3200 kb; con los símbolos (-) y (+) se indican las cadenas negativa y positiva respectivamente. Las flechas superiores muestran la linearización del genoma en el nt 1600. El genoma del VHB contiene 4 ORFs (indicados con las flechas en ángulo de 90°) bajo la acción de cuatro promotores (Promotor de Core, preS1, preS2/S y promotor de X) y dos regiones potenciadoras I y II representados con los rectángulos grises. Sobre el genoma linearizado se muestran tres islas CpG; la isla CpG I se expande a través del codón de inicio del gen S, la isla CpG II sobre el potenciador I y la isla CpG III en el codón de inicio del gen de la polimerasa. En la parte inferior se presentan los 5 ARNs mensajeros transcritos y las proteínas codificadas a partir de cada uno (Ríos-Ocampo *et al.*, 2013).

Anexo 2: Ciclo de replicación.



Anexo 2. Ciclo de vida intracelular del VHB. ADNccc: ADN circular covalentemente cerrado; ARNm HBs: ARNm del VHB; ER: retículo endoplasmático; pol: polimerasa (Gerlich *et al.*, 2010).