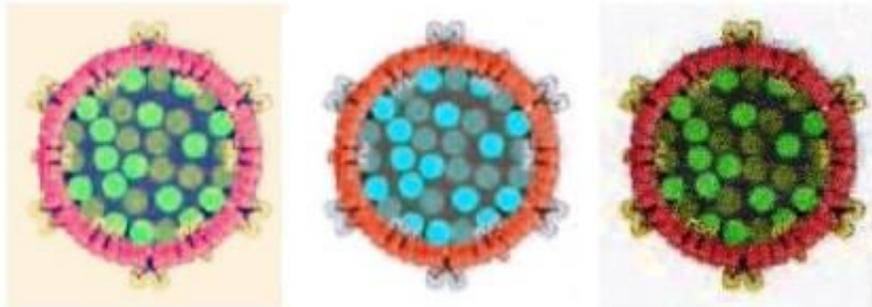




**Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**

**Laboratorio Nacional de Referencia en Hepatitis Virales**

# **Hepatitis Delta en individuos cubanos positivos al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B**



**AUTOR: Dr. Zexi Tan**

**Tesis para optar por el Título de Master en Virología**

**LA HABANA**

**2018**

**Año 60 de la Revolución**



**Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**

**Laboratorio Nacional de Referencia en Hepatitis Virales**

**Hepatitis Delta en individuos cubanos  
positivos al antígeno de superficie del virus  
de la hepatitis B**

**AUTOR: Dr. Zexi Tan**

**TUTORAS: Dra. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, DM, DrC**

**Dra. María Caridad Montalvo Villalba, DM, DrC**

**ASESORA: Dra. Marcia Samada, DM, DrC**

**Tesis para optar por el Título de Master en Virología**

**LA HABANA**

**2018**

**Año 60 de la Revolución**

*Los virus son capaces de producir el apocalipsis de la humanidad.*

# DEDICATORIA

*A todos los jóvenes que tienen interés en la virología.*

# AGRADECIMIENTOS

El mayor agradecimiento es para mi país, China, por darme la oportunidad de estudiar en Cuba y el apoyo financiero.

A mis padres, mi hermana y demás familiares que me confiaron y me brindaron su apoyo emocional, sobre todo en los momentos difíciles.

Al IPK por permitirme realizar la Maestría en Virología y al Departamento de Docencia.

Al Instituto de Salud de Luxemburgo por el apoyo financiero y científico.

A mi tutora Licel que siempre me ha guiado y me ha brindado su experiencia, apoyo y dedicación desde que me incorporé a este laboratorio, ahora por ayudarme a realizar esta investigación, por sus consejos profesionales y del idioma español, por ser más que una tutora.

A mi tutora María Caridad que me explicó todas las dudas que tuve y me revisó mi trabajo varias veces aunque ella era muy ocupada.

A todos los profesores y colegas del Departamento de Virología del IPK por su apoyo incondicional y sincero.

A mis amigas Grechen y Silvia por no ser mis amigas solamente sino mis familiares en Cuba.

A todos los amigos del Departamento de Bacteriología-Micología, profesor Rafael, profesora Lili, profesora Rosy, profesora Rosario, profesora Rosabel, Misleidis, Irina, Oderay, Onelkis y mi compañera china Lei Fu, por tener su apoyo siempre que los necesité.

A todos los que aportaron su granito de arena para que yo culminara este trabajo.

Un agradecimiento especial al videojuego Resident Evil® por abrirme la puerta del mundo de virología.

*Gracias.*

La infección por el virus de la hepatitis delta (VHD) es una de las complicaciones más severas de la hepatitis viral tipo B, con rápida progresión a cirrosis, riesgo incrementado de descompensación hepática y muerte cuando se compara con la monoinfección con el virus de la hepatitis B (VHB). Los datos acerca de la infección por el VHD en Cuba son escasos. Cuatrocientos veinticinco muestras de suero correspondientes a la misma cantidad de individuos positivos al HBsAg, colectadas durante el periodo 2006 - 2011 y 2014 – Mayo 2018 y procedentes de todo el país, fueron analizadas para anticuerpos totales al VHD, y a los positivos se les realizó RCP en tiempo real para identificar replicación viral. Además, se describieron las características clínico-terapéuticas, bioquímicas y virológicas de los pacientes con infección activa VHB/VHD. Dos individuos resultados positivos a anti-VHD (2/425, 0.47%). Uno de ellos resultó asimismo ARN VHD positivo (1/2, 50%). El paciente con infección activa por el VHD poseía esplenomegalia, várices esofágicas grado 1 y fibrosis hepática estadio 1 (F1), además aumento de las enzimas hepáticas y ADN del VHB no detectable. Posterior al tratamiento con interferón pegilado durante 1 año, se apreció una mejoría de su perfil bioquímico (ALT: 117 UI/L vs 49 UI/L,  $P=0,0500$ ) y una respuesta virológica efectiva. La prevalencia de la infección por el VHD en portadores cubanos del HBsAg es baja, mostrando un equilibrio entre la prevalencia del VHB y el VHD, relacionado posiblemente por la estrategia seguida en el Programa de Prevención y Control de la hepatitis B y las elevadas coberturas de vacunación.

	Pág.
I.INTRODUCCIÓN -----	1
II. OBJETIVOS -----	4
III. MARCO TEÓRICO-----	5
III.1. Historia del VHD-----	5
III.2. Taxonomía-----	5
III.3. Estructura y morfología del VHD -----	6
III.3.1. ARN del VHD -----	6
III.3.2. Riboenzima-----	7
III.3.3. Proteínas virales -----	7
III.3.3.1. Funciones de las dos isoformas del HDAG -----	8
III.3.3.1.1. Funciones del L-HDAG -----	8
III.3.3.1.2. Funciones del S-HDAG-----	9
III.3.4. Ciclo de replicación viral-----	10
III.3.4.1. Adsorción y entrada -----	10
III.3.4.1.1. Hepatotropismo -----	10
III.3.4.1.2. Factores virales -----	10
III.3.4.1.3. Factores del huésped -----	11
III.3.4.2. Pérdida de la cápside y transporte nuclear -----	12
III.3.4.3. Replicación-----	12
III.3.4.3.1. El modo de replicación doble "rolling-circular" -----	12
III.3.4.3.2. Papel del S-HDAG-----	13
III.3.4.3.3. Motivos para transcripción y replicación -----	13
III.3.4.3.3.1. Clivaje -----	14
III.3.4.3.3.2. Ligación -----	14
III.3.4.4. Ensamblaje y liberación -----	14

# ÍNDICE

III.4. Patogénesis -----	15
III.5. Respuesta inmune ante la infección por VHD -----	16
III.6. Curso clínico de la infección -----	17
III.7. Diagnóstico de la infección por VHD -----	19
III.8. Tratamiento-----	20
III.8.1. Marcadores de la respuesta terapéutica -----	21
III.9. Epidemiología molecular del VHD: Genotipos -----	21
III.10. Características de la infección por VHD y la vacunación contra hepatitis B en Cuba-----	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS-----	24
IV.1. Población de estudio y colecta de muestras -----	24
IV.1.1. Criterios de inclusión de las muestras-----	25
IV.1.2. Recolección de datos en las Historias clínicas -----	27
IV.2. Técnicas serológicas -----	27
IV.2.1. Detección de anticuerpos anti-HDV-----	27
IV.2.2. Breve descripción de los pasos del Ensayo -----	27
IV.3. Técnicas moleculares -----	29
IV.3.1. Extracción de ARN, transcripción reversa y amplificación mediante RCP-TR-----	29
IV.4. Otros ensayos serológicos utilizados en la presente investigación-----	31
IV.5. Consideraciones Éticas-----	31
IV.6. Análisis estadístico-----	32
IV.7. Diagrama de flujo-----	33
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN-----	34
V.1. Prevalencia de la infección por el VHD en individuos cubanos positivos al HBsAg -----	34

# ÍNDICE

V.2. Identificar la presencia de replicación viral en las muestras positivas a anti-VHD -----	44
V.3. Describir los aspectos clínico-terapéuticos, bioquímicos y virológicos de los pacientes con co-infección por los VHB y VHD -----	47
VI. CONCLUSIONES-----	56
VII. RECOMENDACIONES-----	57
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS-----	58
IX. ANEXOS	

### I. INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis delta (VHD) es una de las complicaciones más severas de hepatitis virales con rápida progresión a cirrosis, riesgo incrementado de descompensación hepática y muerte cuando se compara con la monoinfección con el virus de la hepatitis B (VHB) [1, 2].

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en los años 80s, demostraron que el virus tiene una diseminación mundial con prevalencias que varían en diferentes partes del mundo, independientemente de la prevalencia del VHB [3]. Hoy en día conocemos que de los 350 millones de portadores crónicos del VHB, cerca del 5% está superinfectado con el VHD, lo que lleva a un estimado global de 15-20 millones de casos de infección crónica por el VHD a nivel mundial. Pero este dato puede estar sesgado por la ausencia de datos en algunos países. Las áreas de mayor prevalencia son el Mediterráneo, Medio Oriente, Centro y Noreste de Asia, África Central y Occidental, Amazonas, Norte y Sur América y la región Asia-Pacífico. Mongolia es un país con una prevalencia particularmente muy alta, con cerca de la tercera parte de las hepatitis atribuibles al agente delta [4].

El VHD es un virus defectivo, ya que requiere de la presencia del antígeno de superficie del VHB (HBsAg) para ensamblar las partículas virales infecciosas [5]. Dos patrones de infección por el VHD se han descrito: co-infección y superinfección con el VHB [6, 7].

El virión es una partícula esférica de aproximadamente 36 nm de diámetro, está compuesta por una cubierta externa que contiene el HBsAg y lípidos del hospedero. La nucleocápside interior consiste en el antígeno delta (HDAg, pequeño y grande) y el genoma ARN circular de cadena única, sentido negativo, de aproximadamente 1.7 kb [5, 8, 9]. Posee un único marco abierto de lectura (MAL) que codifica para el HDAg, el cual se transcribe como HDAg pequeño (S-HDAg, por sus siglas en inglés, *small*) y HDAg grande (L-HDAg, por sus siglas en

## I. INTRODUCCIÓN

inglés, *large*). El S-HDAg se necesita para la síntesis del genoma del VHD, mientras que el L-HDAg inhibe la síntesis del ARN-VHD y es esencial para la formación de la partícula delta [10].

Estudios previos han demostrado la existencia de 8 genotipos del VHD con una diversidad de la secuencia nucleotídica de hasta un 16% dentro del mismo genotipo, comparada con una diversidad de un 20-36% entre diferentes genotipos del VHD [11, 12]. El genotipo 1 está distribuido mundialmente y representa el genotipo dominante en Europa [13]. El genotipo 2 se detecta fundamentalmente en el Sudeste Asiático y el genotipo 3 se encuentra exclusivamente en la parte Norte de Sur América [14-17]. El genotipo 4 se ha detectado en Taiwán de China y Japón, mientras que los genotipos más recientemente identificados 5, 6, 7 y 8 se han detectados en África Occidental y Central [11, 18-20].

Varios estudios han sugerido que los genotipos del VHD pueden influir en la severidad de la enfermedad. El genotipo 1 puede estar asociado con una enfermedad leve y severa, mientras que el genotipo 2 induce principalmente una enfermedad de curso leve [21]. El genotipo 3 está ligado con brotes severos de hepatitis y variantes de genotipo 4 pueden estar asociadas con enfermedad hepática leve o severa [22, 23]. Es poco conocido la severidad de la enfermedad en los genotipos identificados recientemente del 5 al 8 [24]. Estudios posteriores son necesarios para determinar si las diferencias en la patogenicidad depende de las diferencias biológicas entre los genotipos de VHD, los genotipos de VHB co-infectante y/o la respuesta inmune del hospedero [25].

En 1992 se definió una Estrategia Nacional para la eliminación de la Hepatitis B dirigida a los siguientes grupos de población: la vacunación universal a todos los recién nacidos, la vacunación a la población menor de 20 años para el año 2000 y la vacunación de los principales grupos de riesgo. Se lograron coberturas anuales de vacunación anti-hepatitis B de más del 99% en los últimos 16 años, produciéndose una drástica reducción de la incidencia de la hepatitis B en la

## **I. INTRODUCCIÓN**

población general, de más del 99%. Después de 24 años de vacunación a los grupos antes mencionados, la tasa de nuevas infecciones se ha reducido 100 veces (0.3/100 000 habitantes) [26].

Actualmente, la información disponible acerca de la prevalencia de la infección por el VHD en Cuba es escasa, como antecedentes se recoge un estudio en el año 1988, donde el 8,3% de los sueros procesados resultó positivo de anticuerpos anti-VHD [27]. Tampoco se han descrito las características clínico-terapéuticas, bioquímicas y virológicas de la infección por este agente. El conocimiento y la descripción de la infección por el VHD aportaran datos importantes para el manejo clínico-terapéutico y el control de la entidad.

## II. OBJETIVOS

### General:

Describir la infección por el virus de hepatitis delta en un grupo de individuos cubanos portadores del HBsAg.

### Específicos:

1. Determinar la prevalencia de la infección por el VHD en individuos cubanos positivos al HBsAg.
2. Identificar la presencia de replicación viral en las muestras positivas a anti-VHD.
3. Describir los aspectos clínicos-terapéuticos, bioquímicos y virológicos de los pacientes con infección activa por el VHD.

### III. MARCO TEÓRICO

#### III.1. Historia del VDH

El VHD, es el agente causal de la hepatitis delta o hepatitis D; fue identificado por primera vez en 1977 por Mario Rizzetto y colegas en una cohorte de pacientes infectados por el VHB; quienes sufrieron una hepatitis grave [28]. Algunas de las biopsias hepáticas de estos pacientes se encontraron positivas después de la tinción con antisueros de algunos pacientes positivos al HBsAg y en ausencia de la proteína del core del VHB (HBcAg). Esto quedó demostrado por microscopía electrónica y tinción negativa con anticuerpos monoclonales específicos. Este novedoso "sistema antígeno-anticuerpo" (denominado antígeno D/anticuerpos anti-D), aunque asociado a la infección por VHB, era inmunológicamente diferente de HBsAg, HBeAg y HBcAg. El HDAg aislado de estos primeros pacientes fue una herramienta para cribar los sueros de otros pacientes de diversos orígenes geográficos y asociar la presencia de anticuerpos anti-D circulantes a la enfermedad hepática crónica [29, 30]. Posteriormente, se confirmó que el antígeno d estaba asociado con un "agente delta" patógeno transmisible, denominado como VHD. De hecho, se demostró que el suero de pacientes positivos a VHD infectaba a los chimpancés en presencia del VHB, tanto en condiciones de co-infección o super-infección [31]. En estos chimpancés, se identificó que el antígeno d circulaba en forma de partículas, que contenían HBsAg y una molécula de ARN de bajo peso molecular, planteando por primera vez la hipótesis de que el VHD es un virus defectivo, que aporta el ARN satélite al VHB [32].

Existen varias hipótesis que justifican el origen del VHD (Anexo 1).

#### III.2. Taxonomía

El VHD fue reconocido por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, del inglés *International Committee Taxonomy Viral*), como una nueva especie de virus que infecta vertebrados, el único representante del género Deltavirus [33]. Aunque, el VHD es estructuralmente similar y en su modo de replicación a

### **III. MARCO TEÓRICO**

fitopatógenos, viroides y virusoides; es suficientemente diferente para ser asignado a un género separado. El VHD se clasifica comúnmente como un virus satélite del VHB, ya que se basa en el principio biológico de que VHD es incapaz de infectar en ausencia del VHB [8, 34].

#### **III.3. Estructura y morfología del VHD**

El VHD es un agente subviral esférico con una envoltura de aproximadamente 36 nm de diámetro [35](Anexo 2). La partícula de virus contiene un núcleo de ribonucleoproteína (RNP) que consiste en una copia del genoma de ARN y aproximadamente 200 copias de la única proteína codificada por virus, el HDAg [36]. El VHD en su envoltura contiene el HBsAg, por lo que los dos virus comparten cubiertas prácticamente indistinguibles [37].

##### **III.3.1. ARN del VHD**

El virión del VHD contiene un genoma de ARN negativo monocatenario circular, con una fuerte conformación de RNA cuasi-doblemente flexible y secundaria. Durante la replicación en las células infectadas, se pueden detectar otros dos ARN virales principales: la molécula complementaria genómica, llamada antígenoma, y el ARNm de VHD (Anexo 3). El genoma del VHD está constituido por 1672-1697 nucleótidos (nt), es el más pequeño de todos los virus que afectan a los mamíferos y presenta algunas similitudes con los homólogos de viroides de plantas. El material genético del VHD tiene un alto contenido de citosina + guanina (60%) y aproximadamente un 74% formando pares de bases. Esto le permite plegarse simulando una estructura tipo varilla [38, 39]. Las células infectadas pueden contener alrededor de 300,000 moléculas del genoma del VHD, divididas entre el núcleo y el citoplasma, lo que pone en evidencia su alto índice de replicación [40, 41].

El ARN antígenómico del VHD es un intermediario replicativo de polaridad positiva, complementario a la secuencia del genoma y contiene la secuencia de codificación para HDAg. Este es de 5-22 veces menos abundante que el genoma y se encuentra exclusivamente en el núcleo de las células infectadas, por tanto no

### **III. MARCO TEÓRICO**

se empaqueta en viriones[40, 41]. Las proteínas del VHD se traducen a partir de un ARNm del VHD de 800 nt de longitud, que se transcribe mediante ADN/ARN-polimerasa dependiente de ADN [42-44].

#### **III.3.2. Riboenzima**

Se identificaron pequeñas secuencias de ARN de autoescisión (de aproximadamente 85 nt contiguos) tanto en el genoma del VHD como en el antigenoma [39, 45]. Estas fueron denominadas riboenzimas, cuyas secuencias están muy bien conservadas entre los genotipos de VHD, son responsables de la escisión de moléculas de ARN multiméricas que surgen durante la transcripción en secuencias genómicas o antigenómicas de una unidad de longitud [46].

La riboenzima del VHD tiene características estructurales y funcionales únicas y es distinta de las viroides [47]. La caracterización de su estructura cristalina permitió identificar el mecanismo de escisión de tipo pseudoknot [48]. En estudios recientes han identificado secuencias de riboenzimas tipo VHD en genomas de células huésped [46].

#### **III.3.3. Proteínas virales**

El HDAG es la única proteína codificada por VHD, es una fosfoproteína y se puede encontrar en dos formas: una corta llamada S-HDAG y una grande llamada L-HDAG, con pesos moleculares de 24 kDa (195 aminoácidos) y 27 kDa (214 aminoácidos), respectivamente [49]. Los estudios han demostrado que el S-HDAG promueve la replicación del ARN; mientras que el L-HDAG promueve la envoltura del ARN VHD para ensamblar el virión [38, 50-53].

Durante el ciclo de replicación, el antigenoma experimenta una modificación postranscripcional donde el gen que codifica el S-HDAG se modifica por una enzima llamada adenosina desaminasa (ADAR1), una proteína del huésped, sustituyendo la adenina por una inosina. De esta forma se intercambia indirectamente el codón de parada UAG para un UGG-triptófano, conocido como

### III. MARCO TEÓRICO

el sitio ámbar / W, que dará lugar al gen que codifica el L-HDAg con 19 aminoácidos (aa) adicionales [54-57].

La diferencia entre las dos formas de HDAg está en los 19 aminoácidos adicionales en la región C-terminal de L-HDAg. Ambas isoformas HDAg tienen múltiples dominios funcionales en común, que incluyen el dominio de unión al ARN (RBD, del inglés *RNA-binding domain*), una señal de localización nuclear (NLS, del inglés *nuclear localization signal*), un dominio de espiral en espiral (CCD, del inglés *coiled coil domain*) y una porción C-terminal de la secuencia rica en prolina y glicina. Los 19 aa adicionales de L-HDAg son una señal de ensamblaje del virus (VAS, del inglés *virus assembly signal*), que es una secuencia altamente variable y específica para cada genotipo [58]. Esta es crucial para el ensamblaje del virus y sirve como un sitio de unión, el que interactúa con HBsAg / membrana [34].

El HDAg sufre otras modificaciones postranscripcionales tales como la fosforilación, la acetilación y la metilación, y en el caso del L-HDAg, la isoprenilación [59-63]. La metilación ocurre en la Arginina 13 la acetilación en la Lisina 72 y la fosforilación en la serina 123 y 177 fueron relacionadas con la localización sub-celular del HDAg y la replicación del ARN [62, 64-67]. La mayoría de estos cambios son importantes para las funciones del S-HDAg en la replicación del ARN del VHD, que actúa estimulando directamente el alargamiento de la transcripción mediante la sustitución del factor de elongación del represor de transcripción vinculado a la ARN polimerasa II [66, 68].

#### III.3.3.1. Funciones de las dos isoformas del HDAg

Aunque los dos HDAg comparten secuencia y dominios funcionales, desempeñan papeles muy distintos en el ciclo de replicación del VHD. El S-HDAg interviene en la acumulación del ARN del VHD, mientras que el L-HDAg actúa como un inhibidor de la replicación del VHD y es esencial para el ensamblaje de nuevas partículas del virus [69, 70].

##### III.3.3.1.1. Funciones del L-HDAg

### III. MARCO TEÓRICO

La proporción de esta forma en relación con la cantidad total de HDAG acumulados, aumenta durante el ciclo de replicación de 0% a alrededor 30%, debido a los procesos de edición del antígenoma del VHD [71]. Esto es suficiente para suprimir la replicación pero permite la acumulación de genomas virales, que luego pueden empaquetarse en nuevas partículas infecciosas con la ayuda de L-HDAG. La señal de exportación nuclear (NES, del inglés *nuclear export signal*) presente en L-HDAG permite que la RNP viral se exporte desde el núcleo al citoplasma para su ensamblaje [72]. La RNP del VHD interactúa con el HBsAg en el retículo endoplasmático para formar nuevos viriones infecciosos, que luego se secretan para propagar más rondas de infección viral [73]. Este ensamblaje de nuevos viriones solo ocurre cuando los HBsAg están presentes; de lo contrario, las RNP virales retornan al núcleo [73].

#### III.3.3.1.2. Funciones del S-HDAG

El S-HDAG se ha estudiado más que la forma grande, probablemente debido al hecho de que se requiere para la acumulación del ARN del VHD. Varias funciones le han sido atribuidas a esta proteína viral, incluidas las funciones putativas [35].

El S-HDAG está presente en los viriones que forman RNP virales con el genoma del VHD. Una de las primeras tareas que realiza es el transporte del genoma viral al núcleo de las células infectadas, donde tiene lugar la síntesis de ARN dirigida por ARN polimerasa. Este transporte se logra mediante la presencia de NLS y el RBD. La entrada al núcleo puede ser facilitada por la 2 $\alpha$  carioferina, ya que esta interactúa *in vitro* con el S-HDAG [74].

Otro rol atribuido al S-HDAG es la regulación de la edición del ARN del VHD, particularmente la desaminación por la ADAR-1. Esta edición ocurre en múltiples ubicaciones en los ARN viral, pero se centra en la cadena antígenómica, en el codón de terminación adenosina [75]. Se ha demostrado que el S-HDAG suprime la edición en este codón de parada, cuando se expresa en células transfectadas a niveles cercanos a los observados durante la replicación del VHD [75]. Esta observación sugiere que el antígeno juega un papel en la limitación de la edición

### III. MARCO TEÓRICO

de ARN del VHD, ya que se ha demostrado que la edición excesiva inhibe la acumulación del material genético viral [76].

Además, otro rol atribuido al S-HDAg es el de chaperona del ARN del VHD. Los estudios *in vitro* sugieren que el S-HDAg puede estimular la actividad de la riboenzima del ARN del VHD [77]. Por lo que se deduce que el S-HDAg puede estar directamente implicado en el procesamiento postranscripcional de transcritos multiméricos nacientes, mediante la división de sus moléculas. Sin embargo, debe señalarse que los estudios anteriormente mencionados de Lazinski y Taylor indican que, *in vivo*, el S-HDAg no se necesita directamente para la escisión de riboenzimas y la ligazón posterior [78].

#### III.3.4. Ciclo de replicación viral (Anexo 4)

##### III.3.4.1. Adsorción y entrada

###### III.3.4.1.1. Hepatotropismo

El hepatotropismo del VHD y su capacidad para garantizar un ciclo replicativo productivo están relacionados con el proceso de entrada y la coinfección de las células con el VHB. Mientras que un ciclo requiere la expresión de glicoproteínas de superficie del VHB en la misma célula para permitir el ensamblaje de viriones VHD, lo que indica que ningún otro componente del VHB parece contribuir a la replicación del VHD y viceversa [79]. Por el contrario, el VHB requiere de factores de transcripción específicos del hígado; la replicación del genoma del VHD puede ocurrir en varios tipos de células de mamíferos siempre que su genoma se administre experimentalmente a las células [10]. Dada la estructura de envoltura compartida de ambos virus, se cree que los mecanismos de inserción y entrada son similares entre el VHB y el VHD, y la mayoría del conocimiento actual sobre los mecanismos de entrada al VHB se han obtenido en modelos de infección por el VHD [80].

###### III.3.4.1.2. Factores virales

### III. MARCO TEÓRICO

Para ambos virus, la presencia de la proteína de la envoltura HBsAg-L es esencial para la infectividad. Las mutaciones específicas en los 75 aa N-terminales del dominio Pre-S1 o la inhibición de la miristilación pueden bloquear la infectividad [81, 82]. El dominio de tirabuzón antigénico de HBsAg-S y el patrón de glicosilación también parecen jugar un importante papel, ya que las mutaciones específicas en este dominio pueden inhibir la infección, independientemente del dominio PreS1 [83, 84].

#### III.3.4.1.3. Factores del huésped

La unión viral a la superficie celular precede a la entrada específica del receptor para el VHB y está mediada por proteoglicanos de sulfato de heparina celular (HSPG, del inglés *heparin sulfate proteoglycans*) [85, 86]. Esto fue confirmado recientemente para VHD, [87, 88] ya que aún no se han identificado los HSPG involucrados en la unión viral al VHB/VHD, a pesar de que recientemente se informó que Glypican-5 era predominante en este proceso [89]. Este paso, aunque es necesario, no es suficiente para la infección, ya que la entrada de virus unidos a HSPG todavía puede inhibirse [90]. También se ha sugerido un papel potencial para los receptores purinérgicos (P2YR, P2XR) en el proceso de unión tanto del VHD como del VHB, a partir del efecto inhibitorio de la suramina [87, 91].

Recientemente, Yan y colaboradores identificaron el péptido co-transportador de taurocolato de sodio humano (hNTCP, del inglés *human sodium taurocholate cotransporting peptide*) como un receptor funcional para VHB y VHD [92]. El NTCP se localiza en la membrana basolateral de los hepatocitos y participa en la circulación enterohepática de las sales biliares. La infección viral parece estar respaldada por los aa implicados en la unión del ácido biliar y no por los que intervienen en la unión del sodio [93]. La interacción entre NTCP y HBV/VHD parece estar mediada por el virus 75 aa N-terminal de la PreS1 y una región de unión a NTCP, localizada en la membrana celular [94]. Esto confirma el hecho de que el VHD puede replicarse en muchos tipos de células, si su genoma se administra correctamente, recientemente se demostró que un ratón transgénico hNTCP se infecta por el VHD [95].

### III.3.4.2. Pérdida de la cápside y transporte nuclear

Se piensa que el VHB se internaliza mediante endocitosis dependiente de clatrina, a través de compartimentos endosómicos tempranos y tardíos, independientemente de la acidificación y la actividad de la proteasa [96, 97]. Tal evidencia no está disponible para VHD, aunque puede ser respaldada por la identificación de L-HDAg como una proteína similar a clatrina-adaptador [98]. Los pasos que median el transporte nuclear posterior a la fusión de la RNP del VHD y la eliminación del genoma vírico no se conocen por completo [74].

### III.3.4.3. Replicación

Durante toda la replicación, el ARN antigenómico se limita al núcleo, mientras que las moléculas de ARN genómico pueden entrar en otro ciclo de replicación nuclear o exportarse al citoplasma para ensamblarse en nuevas partículas infecciosas [40].

#### III.3.4.3.1. El modo de replicación doble "rolling-circular"

Ahora se acepta que VHD tiene una replicación de ARN dependiente de ARN en un "mecanismo de doble círculo rodante", que implica el reclutamiento de ARN polimerasas dependientes de ADN de la célula huésped y probablemente su cambio en la especificidad del genoma molde [10, 34]. La replicación del doble círculo rodante (similar a la replicación simétrica del círculo rodante de viroides vegetales, pero modificada para incluir una etapa de síntesis de ARNm) se basa en dos moldes circulares de ARN de polaridad inversa, genoma y antigenoma, y la generación de transcritos multiméricos intermedios [46].

Para la replicación del ARN del VHD, se necesitan tres actividades enzimáticas: una polimerasa para sintetizar cadenas oligoméricas a partir de moldes circulares, una actividad de ARNasa dependiente de riboenzimas para dividir las hebras de longitud unitaria y una ligasa para circularizar monómeros [46].

A diferencia de algunos virus de ARN con genomas más grandes, VHD no posee su propia ARN-polimerasa dependiente de ARN. Además, a diferencia de otros virus, no usa la polimerasa de su virus auxiliar y, por lo tanto, depende

### III. MARCO TEÓRICO

completamente de las propiedades de la célula huésped [34]. Varias evidencias respaldan el hecho de que la polimerasa II del ARN (ARN Pol II) estaría involucrada en la replicación del VHD: en primer lugar, el ARNm de VHD muestra una cola de 50 cap y 30 poli-A como ARNm celular; en segundo lugar, se ha demostrado que la transcripción del ARN del VHD es inhibida por dosis bajas de a-amanitina; y finalmente, se ha demostrado que ARN pol II es capaz de unirse al ARN del VHD de polaridad tanto genómica como antigenómica [43, 44, 99, 100]. En otros informes, la síntesis de antigenoma parecía ser resistente a la a-amanitina, lo que sugiere que Pol I también podría estar involucrada [101]. Esta posibilidad es respaldada por otros dos estudios que sugieren que tanto Pol I como Pol III podrían interactuar con el ARN del VHD, y que la síntesis del genoma y del antigenoma podría tener lugar en distintas áreas nucleares [102, 103]. Aunque predominan varias hipótesis y aún no se ha aclarado el papel exacto de las diversas polimerasas, todos los estudios coinciden en que el VHD puede redirigir una ARN polimerasa dependiente del ADN a su molde de ARN. El mecanismo molecular subyacente es, sin embargo, ampliamente desconocido [46].

#### III.3.4.3.2. Papel del S-HDAg

El S-HDAg es un candidato importante para explicar este secuestro de ARN pol II. Esta es una proteína nuclear conocida por unirse al ARN del VHD, que presenta similitudes estructurales con factores de transcripción (por ejemplo, NELF-A), y puede someterse a acetilación y metilación como otras proteínas reguladoras de la transcripción [34]. La S-HDAg puede unirse a la ARN Pol II y mejorar la transcripción ya sea por estimulación directa de elongación o por reversión de efectos inhibidores [104]. Además, se ha demostrado que la S-HDAg interactúa bioquímicamente con 9 de las 12 subunidades de la ARN pol II, en un cribado combinado de interferencia de ARN proteico [105]. Esta interacción puede no estar restringida a Pol II, ya que se ha demostrado que el S-HDAg interactúa y/o localiza con proteínas nucleares (por ejemplo, B23 y nucleolina), lo que podría respaldar adicionalmente la implicación de la Pol I [106].

#### III.3.4.3.3. Motivos para transcripción y replicación

### **III. MARCO TEÓRICO**

La presencia de sitios de iniciación de transcripción o promotores en el ARN del VHD también se debate. Parece ser el caso del ARNm de VHD [44], posee una región de 50 nt en un extremo del ARNm de HDAG, que coincide con un extremo del ARN genómico. Esta muestra una estructura secundaria compleja, que puede jugar un papel importante en la replicación del VHD [107].

#### **III.3.4.3.3.1. Clivaje**

Las moléculas de genoma y antigenoma se procesan a partir de precursores lineales de longitud unitaria, que necesitan una actividad catalítica de escisión. Esta actividad es ejercida por las secuencias de auto-escisión de riboenzima, presentes tanto en el genoma como en el anti-genoma que deben transcribirse al menos dos veces a partir de las plantillas circulares, para dar lugar a una unidad de longitud, justificando la presencia de multímeros [46].

#### **III.3.4.3.3.2. Ligación**

Se necesitaría una actividad de ligasa para circularizar los monómeros lineales en moléculas de genoma y antigenoma. Mientras un estudio sugirió el reclutamiento de una ligasa de célula huésped, la ligadura del ARN del VHD ocurrió solo en células de mamíferos, otra investigación mostró propiedades de autoligado de secuencias de riboenzimas del VHD [108, 109].

#### **III.3.4.4. Ensamblaje y liberación**

Para formar viriones del VHD, la ribonucleoproteína VHD está envuelta por al menos S- y L-HBsAg, lo que significa que en una infección natural, el VHD solo puede liberarse de células coinfectadas con HBV. Muchas preguntas permanecen sin respuesta con respecto al ensamblaje y lanzamiento de VHD. Los nuevos modelos de infección desarrollados deberían ayudar a dilucidar este paso del ciclo de vida del VHD en paralelo con una mejor comprensión del ensamblaje de VHB [46].

En contraste con el VHB, el dominio citoplásmico de HBsAg, que abarca la unión entre PreS1 y PreS2, no parece ser crucial para la liberación de VHD; por lo tanto,

### III. MARCO TEÓRICO

se ha sugerido que el VHD usaría principalmente la vía de liberación de partículas subvirales (a través del Golgi) en lugar de la vía corporal multivesicular, involucrada en el ensamblaje de viriones infecciosos del VHB [5, 110, 111]. En cuanto al tráfico posterior a la entrada de la RNP del VHD, la clatrina también podría estar involucrada en la exportación de partículas víricas [112]. Con respecto a los componentes virales, la farnesilación de la secuencia C terminal del L-HDAg es necesaria para la envoltura VHD, ya que media la interacción con la región S del HBsAg. La farnesilación implica la fijación de una cadena de 15 carbonos al motivo del péptido C211XXQ, que está presente en el extremo carboxi-terminal del L-HDAg y se conserva entre todos los genotipos del VHD [113].

#### III.4. Patogénesis

El VHD se replica solo en los hepatocitos. El daño celular asociado con la infección involucra principalmente al hígado. El daño hepático en el curso de la infección esta mediado por la respuesta inmune [114]. Sin embargo, los datos de los chimpancés experimentales también han sugerido un efecto citopático directo del VHD en los hepatocitos, particularmente en el establecimiento de la hepatitis aguda [115-118]. Se postula que en la infección aguda por el VHD, los hepatocitos infectados experimentan cambios degenerativos caracterizados por citoplasma con reducción eosinofílica y núcleos picnóticos. La presencia de células inflamatorias en el parénquima hepático es otro de los hallazgos, lo que concuerda con el daño hepatocelular citopático. Estas evidencias fueron obtenidas a partir de estudios in vitro (cultivo celular) y humanos [119-121]. Se cree que el antígeno delta pequeño expresado por hepatocitos infectados, es responsable de este efecto citopático directo del VHD, mientras que el antígeno delta grande *per se* no es citotóxico, promueve la persistencia del VHD (cronicidad) y hace que los hepatocitos sean susceptibles al daño mediado por el sistema inmune [119].

Los modelos experimentales para ampliar el conocimiento sobre la patogénesis del VHD es la marmota ya que ha demostrado ser muy útiles para explorar la cronicidad asociada con la sobreinfección por el VHD [122, 123]. Además, estos modelos también son muy valiosos para evaluar la eficacia y la función protectora

### **III. MARCO TEÓRICO**

de los nuevos tratamientos antivirales, incluidos los candidatos a vacunas. Los estudios sobre estos modelos experimentales han revelado que tanto la inmunización de proteínas como la inmunización de ADN del VHD son insignificantes para proteger contra la superinfección por el VHD, destacando la necesidad de adoptar diferentes enfoques para desarrollar una vacuna contra el virus [124, 125].

Existe una variación en la respuesta inmune durante la infección aguda y crónica por VHD, lo que puede explicar la persistencia y la cronicidad de la sobreinfección por VHD [123, 126]. Los linfocitos T citotóxicos son los principales responsables de eliminar el virus al destruir las células infectadas por el VHD. La respuesta inmune celular adaptativa es retardada e insuficiente para reconocer epítomos víricos, lo que se traduce en la incapacidad de eliminar la infección y el establecimiento de una infección crónica. Se ha observado insuficiencia hepática fulminante en el 1% de los pacientes coinfectados por los VHB/VHD, mientras que esta se presenta en el 5% de los superinfectados con el VHD. Se ha propuesto, que una respuesta inmune exagerada, particularmente una mediada por células, interviene en la necrosis hepatocitaria masiva y el daño hepático en la insuficiencia hepática fulminante [127, 128].

También se cree que la patogénesis del VHD está influenciada por la interacción del VHD con el VHB, lo que aún no ha sido dilucidado por los grupos de investigación [114, 129]. Se sabe que la infección por VHD ocurre como una coinfección o una sobreinfección. Una coinfección con VHB/VHD suele erradicar ambos organismos y, a menudo, da como resultado una recuperación completa, mientras que una superinfección a menudo progresa a una infección crónica por el VHD. Los pacientes con hepatitis B crónica que desarrollan una superinfección con hepatitis D también pueden sufrir insuficiencia hepática aguda, lo que provoca ascitis y encefalopatía hepática [130].

#### **III.5. Respuesta inmune ante la infección por VHD**

### III. MARCO TEÓRICO

Se conoce que la patogénesis de la lesión hepática en la infección por el VHD no es directamente citopática, pero se sabe que están involucrados los mecanismos mediados por el sistema inmune. Después de la entrada del virus en los hepatocitos, su antígeno se procesa en el retículo endoplasmático del citoplasma de la célula y se presenta en la superficie de la célula en asociación con la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I, del inglés *major histocompatibility complex class I*). Los linfocitos T citotóxicos CD8 + reconocen el antígeno procesado endógenamente y presentado en el contexto de las proteínas MHC-I y destruyen la célula infectada mediante dos mecanismos: liberación de perforinas y granzimas y una interacción entre el receptor FAS y el ligando FAS. Ambos mecanismos conducen a la fragmentación del ADN y la apoptosis de las células diana [131].

En segundo lugar, los antígenos exógenos y las partículas víricas no infecciosas son endocitados por las células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés *antigen present cells*), tales como macrófagos o células Kuffer, linfocitos B y células dendríticas. Estas presentan los antígenos virales en su superficie en el contexto de las proteínas MHC clase II. Las células T cooperadoras (Th, del inglés *T helper*) CD4 + reconocen estos antígenos y de este modo, se activa un clon de células Th específicas contra el virus y comienza a proliferar para producir la expansión clonal; con el fin de eliminar la infección viral. Las células T cooperadoras proliferantes se clasifican en tres subtipos: tipo 0 (Th-0), células Th-1 y Th-2, dependiendo de sus funciones y de las citocinas que producen. Por lo tanto, un clon activado de células Th específicas contra el VHD es el componente clave sobre la cual gira la patogénesis del VHD [132].

#### III.6. Curso clínico de la infección

Debido a la necesidad de asociación con el VHB, el VHD solo se puede transmitir en presencia de una infección concomitante con el VHB en una de dos formas (superinfección o coinfección), dependiendo del estado previo del individuo para HBsAg [133].

### III. MARCO TEÓRICO

La coinfección es la infección aguda simultánea del VHB y VHD en un individuo susceptible; esta infección comienza solo después de que el VHB haya infectado a los hepatocitos, y es similar a la hepatitis B aguda [134]. Debido a que el VHB es esencial para el VHD, la tasa de progresión a la cronicidad es similar a la hepatitis B aguda, es decir, entre 2 y 5% [1, 135]. El período de incubación de la hepatitis D depende de los títulos de inóculo del VHB, que determinan el tiempo de incubación de la hepatitis B [8]. La hepatitis aguda puede presentarse como monofásica y bifásica, la primera fase depende de la carga viral del VHB y la segunda del VHD [133]. En el 95% de los casos, se observa curación espontánea, por lo que es una causa importante de hepatitis grave o fulminante [136].

La superinfección es una infección por el VHD en un individuo infectado de forma crónica con el VHB, puede causar como una hepatitis fulminante y las tasas de cronicidad son superiores al 80%, lo que se relaciona con un mayor riesgo de desarrollo temprano de cirrosis y carcinoma hepatocelular [6, 28, 137]. El cuadro clínico es variado, aunque generalmente causa una hepatitis aguda más grave y tiene un período relativamente corto de incubación. En pacientes asintomáticos con HBsAg puede conducir a hepatitis aguda, mientras que en pacientes con hepatitis B activa crónica puede llevar a la exacerbación de los síntomas con descompensación hepática. Los pacientes que tienen una súper infección progresan a hepatitis crónica en aproximadamente el 90% de los casos [133].

La infección por VHD, ya sea en forma de coinfección o superinfección, es una causa importante de hepatitis viral fulminante, causada por el VHD más frecuente que por otras formas de hepatitis viral [133]. Un estudio realizado en Samara, Rusia, mostró que de los 27 diagnósticos de hepatitis viral fulminante, 13 estaban infectados por el VHD, y de estos 11 eran varones y 2 eran mujeres [138]. Algunos estudios en diferentes países de Sudamérica muestran que la hepatitis aguda causada por una coinfección o superinfección por el VHB y el VHD, es la principal causa de hepatitis aguda grave en la región del Amazonas [22, 139].

De acuerdo con un análisis prospectivo en el período de 2006 a 2007, de 33 pacientes de España con VHD crónica, la replicación viral de HBV y VHD fue

### III. MARCO TEÓRICO

bastante variable durante el estudio. En el 54.5% predominaba la replicación del VHD, en el 30.3% predominaba el VHB y en el 15.2% el VHB y el VHD mantenían niveles similares. Estos datos sugieren que hay una supresión del VHB por VHD, pero con una fluctuación en el ritmo de replicación importante de los dos virus [140]. La persistencia de la replicación del VHB, incluso en niveles mínimos, se asocia con un significativo daño hepatocelular [141]. No obstante, se ha descrito una tercera forma en pacientes después del trasplante de hígado: infección latente. Caracterizado por la presencia de anti-VHD en el hígado, en los núcleos de hepatocitos, en ausencia de HBsAg y ARN de VHD en la sangre, la que se asocian con un bajo daño hepatocelular [6].

La forma crónica de la hepatitis D es la más severa y rápidamente progresiva de todas las hepatitis virales crónicas. Conduce a cirrosis en aproximadamente 70% en 5 a 10 años, generalmente en pacientes jóvenes. Uno o dos años después del episodio de hepatitis D aguda, el 15% desarrollan cirrosis. El riesgo de desarrollar cirrosis es 3 veces mayor en una infección por el VHD que en una monoinfección por el VHB [142]. Un estudio en la región amazónica de Brasil mostró que más del 50% de los pacientes tratados con hepatitis D crónica que se sometieron a una biopsia, tenían fibrosis de moderada a intensa [143].

La hepatitis D fulminante tiene una evolución dramática, con un mal pronóstico. El curso clínico ocurre entre 4 y 30 días después del inicio de los síntomas agudos de hepatitis D [144]. Los niveles de transaminasas pueden ser altos, pero con la necrosis hepática masiva, estos niveles tienden a disminuir rápidamente. Lo mismo ocurre con los niveles de replicación del VHD, ya que hay pocos hepatocitos viables. Si no hay un trasplante de hígado en los primeros 10 días, la mortalidad alcanza aproximadamente el 80% [133].

#### III.7. Diagnóstico de la infección por VHD

El primer paso en el diagnóstico de VHD es la detección de anticuerpos de tipo IgM e IgG contra el HDAg (anti-VHD,) en individuos positivos al HBsAg. En pacientes con anti-VHD positivo, el siguiente paso es detectar el ARN del VHD en

### III. MARCO TEÓRICO

el suero para determinar si la presencia del anticuerpo contra el HDAg refleja una infección activa persistente (ARN positivo al VHD) o solo representa una cicatriz serológica decreciente (ARN del VHD negativo). En individuos con una infección por el VHD y enfermedad hepática detectar los cambios en alanina aminotransferasa (ALT) es crucial para distinguir el tipo de infección por VHB/VHD, ya sea en una coinfección aguda o una superinfección en pacientes crónico, ya que el pronóstico y el tratamiento de los dos tipos de infección son diferentes [145, 146].

#### III.8. Tratamiento

El tratamiento apropiado para la hepatitis delta crónica aún se debate ampliamente debido a la falta de un medicamento efectivo. Actualmente, el interferón alfa es la única terapia autorizada para el tratamiento de la hepatitis D crónica [147, 148]. El fármaco más utilizado es el interferón pegilado (IFN-PEG), pero solo alrededor del 25% de los pacientes mantienen una respuesta viral sostenida después de un año de tratamiento [149]. Los niveles de transaminasas se normalizan en solo 40-70% de los pacientes tratados y la recaída ocurre en el 60-97% [150]. Se describe que una respuesta virológica sostenida ocurre cuando la carga viral es negativa, 6 meses después de finalizar el tratamiento [149].

Algunos investigadores han tratado de identificar una terapia más efectiva que la monoterapia con interferón. Sin embargo, estos estudios no fueron alentadores y demostraron que la monoterapia con lamivudina, entecavir, adefovir, tenofovir, famciclovir y ribavirina o la terapia de combinación con el interferón y un análogo de nucleosido no fue más efectiva que la monoterapia con el interferón [151-154].

La duración de la terapia también es controvertida, pero algunos estudios han demostrado que en dos años de tratamiento no obtuvieron mejores resultados que los tratados durante un año [155, 156]. Los pacientes con viremia del VHD y transaminasas elevadas deben iniciar el tratamiento con IFN-PEG alfa 2a o 2b durante un año. En los casos en que el ARN del VHD sea negativo, el tratamiento debe interrumpirse y el paciente debe controlarse. Sin embargo, en los casos en

### **III. MARCO TEÓRICO**

que después de un año de tratamiento todavía quedan niveles detectables de ARN del VHD, se indica otro año de tratamiento, especialmente con niveles elevados de transaminasas [149].

Con la descripción reciente de la entrada VHB mediada por el receptor, también utilizado por el VHD, se desarrollaron nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la hepatitis Delta que interfieren con esta entrada. El bloqueo del polipéptido cotransportador de sodio/taurocolato del receptor específico de VHB-VHD por Myrcludex muestra resultados prometedores [157]. Bogomolov y cols. describieron un Myrcludex B en pacientes con infección crónica con hepatitis D, ya sea solo o en combinación con IFN-PEG alfa 2a, en comparación con pacientes tratados solo con IFN-PEG alfa 2a. La monoterapia con Myrcludex B se asoció con la disminución del ADN del VHB y la mejora de los niveles de ALT, después de 24 semanas de tratamiento. El efecto antiviral fue más pronunciado en combinación con IFN-PEG alfa 2a [158].

#### **III.8.1. Marcadores de la respuesta terapéutica**

El mejor marcador del éxito terapéutico sería la eliminación del HBsAg, pero estos datos son poco frecuentes en la práctica clínica [159]. Por lo tanto, la mejor manera de predecir la respuesta virológica sostenida es el mantenimiento de niveles indetectables de ARN del VHD [149]. Sin embargo, el éxito terapéutico puede estar relacionado con la disminución de los niveles de ARN del VHD, HBsAg y la normalización de ALT; incluso sin su indetectabilidad, se asocia con eventos reducidos relacionados con la enfermedad hepática cuando se trata con IFN [160, 161]. El tratamiento mostró, en la mayoría de los estudios, un bajo porcentaje de indetectabilidad y una alta tasa de recaída. Una respuesta virológica temprana, es decir, un ARN del VHD indetectable o una disminución de tres logaritmo durante los primeros seis meses de tratamiento, puede ser indicativo de una respuesta virológica sostenida [153, 162, 163].

#### **III.9. Epidemiología molecular del VHD: Genotipos**

### III. MARCO TEÓRICO

La diversidad genética viral está relacionada con el origen geográfico de los aislados, y hasta ahora se han identificado ocho genotipos (1-8) clasificados como VHD-1 a VHD-8 [9, 11, 24, 164].

Se estima que hay 400 millones de portadores crónicos del VHB en todo el mundo, entre 15 y 20 millones tienen evidencia serológica de exposición al VHD [9, 165](Anexo 5). Tradicionalmente, las regiones con altas tasas de endemidad son África central y septentrional, la cuenca del Amazonas, Europa oriental y el Mediterráneo, Oriente Medio y partes de Asia [166]. El VHD-1 está ampliamente distribuido y con frecuencia se aísla en Estados Unidos, Europa y Oriente Medio, pero también se ha identificado en Rusia, África, Asia y Brasil [7, 11, 50, 58, 167-169]. El VHD-2, antes conocido como genotipo IIa, se identificó en Japón, Taiwán de China y Rusia [15, 16, 170]. Mientras que, el VHD-3 fue aislado en la región amazónica (Perú, Colombia, Ecuador y Brasil) [17, 22, 169, 171, 172]. El VHD-4 (el antiguo genotipo IIb) circula en Taiwán de China y Japón [16, 170, 173]. Los genotipos VHD-5, VHD-6, VHD-7 y VHD-8 fueron identificados en África [11, 24]. Además, el VHD-8 se aisló en el campo del estado de Maranhão (Brasil) en dos individuos nativos [12].

El VHD-3 es responsable de los brotes de hepatitis fulminante grave y que son comunes en el noreste de América del Sur [7]. Los estudios demuestran que el VHD-3 es frecuente en la Amazonía brasileña, este genotipo es el más agresivo de los genotipos del VHD [7, 17, 22, 168, 174].

La cuenca del Amazonas occidental, que incluye Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia, tienen una de las tasas más altas de infección por VHB en el mundo [175]. En Brasil, esta área corresponde a los estados de Acre, Amazonas, Rondônia y Roraima, con una prevalencia significativa en la población indígena [143, 176].

#### **III.10. Características de la infección por VHD y la vacunación contra hepatitis B en Cuba**

### III. MARCO TEÓRICO

Existen pocos datos acerca de la circulación del VHD en Cuba. En el año 1988 se realizó un estudio donde se estimó la presencia de anticuerpos Delta en el suero de 856 individuos portadores del HBsAg que procedieron de todo el país, el 8,3% de los sueros procesados resultó positivo y los mayores porcentajes se encontraron en las provincias Santiago de Cuba (35,3%), Granma (20,0%) y en el municipio especial Isla de la Juventud (33,3%). El sexo femenino (10,2%) tuvo mayor seropositividad que el masculino (8,0%) y el grupo de edad con mayor positividad fue el de 25 a 34 años (10,4%); resultó con menor positividad el de 45 a 54 años (3,2%) [27].

A partir del desarrollo de la Biotecnología en Cuba, se logró obtener en 1989 una vacuna recombinante contra la Hepatitis B, llamada Heberbiovac-HB, cuyos ensayos clínicos y estudios post-licenciamiento demostraron su elevada inmunogenicidad y eficacia protectora [177]. En 1992 se definió una Estrategia Nacional para la eliminación de la Hepatitis B dirigida a los siguientes grupos de población: la vacunación universal a todos los recién nacidos, la vacunación a la población menor de 20 años para el año 2000 y la vacunación de los principales grupos de riesgo. En este sentido, Cuba se convirtió en uno de los primeros países de América en introducir la vacunación universal de los recién nacidos, logrando coberturas anuales de más del 99% en los últimos 16 años. Se produjo una drástica reducción de la incidencia de la hepatitis B en la población general, de más del 99% (Anexo 6). Después de 24 años de vacunación a los grupos antes mencionados, la tasa de nuevas infecciones se ha reducido 100 veces (0.3/100 000 habitantes) [26].

### IV. MATERIALES Y MÉTODOS

#### IV.1. Población de estudio y colecta de muestras

Cuatrocientos veinticinco muestras de suero, correspondientes a la misma cantidad de pacientes positivos al HBsAg fueron recibidos en el Laboratorio Nacional de Referencia de Hepatitis Virales (LNRHV) en el Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri (IPK). Estas muestras de suero fueron enviadas para confirmar el diagnóstico serológico y/o para realizar diagnóstico molecular del VHB durante el periodo 2006 - 2011 y 2014 - Mayo 2018 procedente de todo el país. Las muestras se encontraban almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que fueron usadas para la presente investigación. La información concerniente a las muestras estudiadas se encontraba disponible en las bases de datos de registro de muestras del LNRHV.

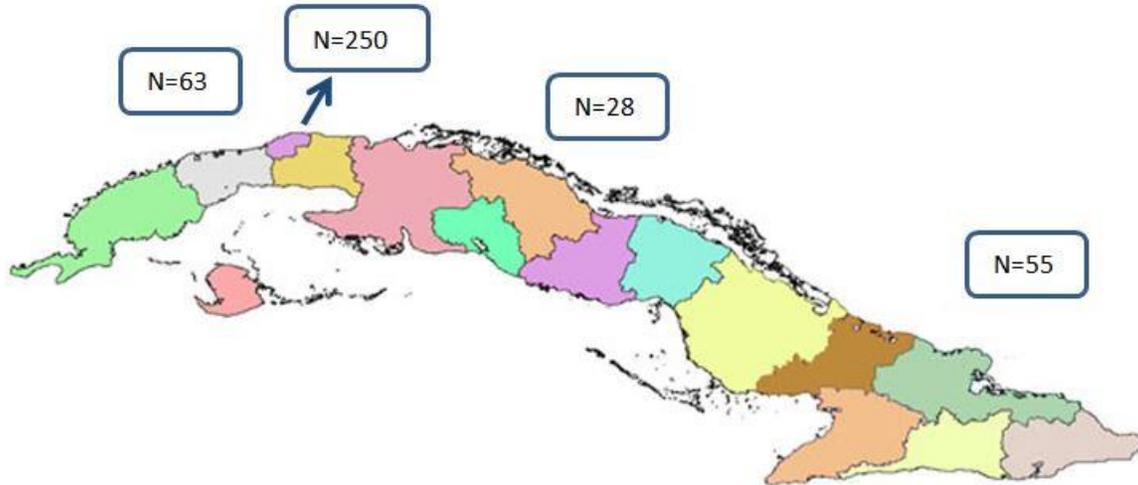
De acuerdo al año de colecta de las muestras, 2 correspondían al año 2006, 2 al 2007, 9 al 2008, 6 al 2009, 1 al 2011, 37 al 2014, 100 al 2015, 92 al 2016, 143 al 2017 y 33 al 2018. De acuerdo a la región del país de donde provenían las muestras estudiadas, aportadas mayormente por la vigilancia y referencia que hace el LNRHV, se clasificaron 146 en: procedentes de la Región Oriental  $n= 55$  (si procedían de las provincias Santiago de Cuba, Guantánamo, Holguín, Granma, Las Tunas y Camagüey), Región Central  $n= 28$  (Cienfuegos, Villa Clara, Sancti Spiritus y Ciego de Avila) y Región Occidental  $n= 63$  (Pinar del Rio, La Habana, Artemisa, Mayabeque, Matanzas) (Figura IV.1).

De acuerdo a los hospitales de donde provenían las muestras (Figura IV.1), aportadas principalmente por el diagnóstico, se clasificaron 250 muestras en: procedentes de Hospital del Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas (CIMEQ)  $n=17$ , IPK  $n=181$ , Hospital Luis Díaz Soto  $n= 7$ , Instituto de Gastroenterología (IGE)  $n=16$ , Sanatorio Santiago de Las Vegas (SSV)  $n= 11$  y 18 provenían de otros hospitales de La Habana. Veintinueve muestras no tenían procedencia.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.1.1. Criterios de inclusión de las muestras:

El único criterio seguido fue el volumen de las muestras de suero (300  $\mu$ l o más).



*Figura IV.1. Mapa representando las provincias de Cuba y el número de muestras por regiones y hospitales de La Habana.*

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Las características demográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de la población de estudio se resumen en la Tabla IV.1.

*Tabla IV.1. Características demográficas, epidemiológicas, clínicas y virológicas de la población de estudio.*

<i>Parámetros</i>		<i>N</i>	<i>%</i>
Edad	Niños (0-18 años)	24	5.65
	Adultos (> 19 años)	401	94.35
Probable ruta de infección, vertiente de la vigilancia o antecedente epidemiológico	Vertical (hijos de madres HBsAg+)	16	3.76
	Sexual	1	0.24
	Riesgo Parenteral (hemodialisados, politransfundidos, enfermedades oncológicas, trasplantados, accidentes de trabajo)	22	5.17
	Desconocida	1	0.24
	Gestantes/madres	79	18.59
	Sin dato disponible	306	72.00
Estatus Clínico	Infección aguda	4	0.94
	Infección crónica	220	51.76
	Hepatitis Grave	4	0.94
	Infección Oculta por el VHB	1	0.24
Co-infecciones	VHB/VHC	1	0.24
	VHB/VIH	87	20.47
	VHB/VHC/VIH	1	0.24
Carga viral del VHB	ADN VHB detectable	104	24.47
	ADN VHB No detectable	104	24.47
	ADN VHB desconocido	217	51.06
Genotipos/subtipos del VHB	A1/Adw2	1	0.24
	A2/Adw2	18	4.23
	D/Ayw2	1	0.24
	Desconocido	405	95.29
Total		425	100

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **IV.1.2. Recolección de datos en las Historias clínicas**

Las Historias clínicas de los pacientes con resultados positivos fueron revisadas y se tomaron los datos concernientes a los marcadores del VHB, el comportamiento de las enzimas hepáticas y los datos más relevantes de la enfermedad.

### **IV.2. Técnicas serológicas**

#### **IV.2.1. Detección de anticuerpos anti-HDV (Juego Comercial HDV Ab ELISA, DIA PRO, Italia) (96 reacciones).**

Principio del ensayo: Es un ensayo competitivo, donde los anticuerpos presentes en la muestra compiten con un anticuerpo policlonal (IgG) específicos para el virus y conjugado con la enzima peroxidasa del rábano picante (HRP, por sus siglas en inglés, *Horseradish peroxidase*) por el antígeno recombinante del VHD de la fase sólida. El ensayo se realizó mediante un sistema de dos pasos con incubación competitiva. La muestra se añadió a la placa y los anticuerpos específicos anti-VHD se combinaron con el antígeno en la fase sólida. Después del paso de lavado se añadió un anticuerpo policlonal conjugado con HRP que se unió al antígeno libre de la placa. Previo lavado se añadió el sustrato cromogénico. La concentración de la enzima conjugada, unida en la fase sólida es inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpos al VHD presentes en la muestra y su actividad se detectó con la adición de un sustrato cromogénico. La concentración de anticuerpos específicos al VHD en la muestra se determina de manera semicuantitativa a través del cálculo de un valor de corte.

#### **IV.2.2. Breve descripción de los pasos del Ensayo**

1. Escoja el número requerido de tiras según número de muestras. Deje el pozo A1 vacío (para blanqueo).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

2. Dispense 100 uL de Control Negativo (CN) en triplicado, 100 uL de calibrador en duplicado, 100 uL de Control Positivo (CP) en un único pozo y luego 100 uL de las muestras.
3. Incube a 37<sup>0</sup>C por 60 minutos (min.).
4. Lave la placa 4-5 ciclos de lavado (aspiración + dispensa de 350 uL/pozo = ciclo) son suficientes para asegurar el ensayo.
5. En todos los pozos excepto A1, pipetee 100 uL de conjugado.
6. Incube a 37<sup>0</sup>C por 60 min.
7. Lave la placa igual al punto 4.
8. Pipetee 100 uL de la mezcla TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tetra-metil-benzidina/peróxido de hidrógeno) en cada pozo incluido el A1.
9. Incube a temperatura ambiente por 20 min., en cámara oscura.
10. Pipetee 100 uL de ácido sulfúrico.
11. Lea la intensidad del color a 450 nm con un blanco de 620-630 nm y A1 para blanquear el instrumento.

### Cálculo del corte del ensayo

$$\text{Corte} = (\text{CN} + \text{CP}) / 5$$

### Interpretación de los resultados

Se realizó mediante la razón entre la Densidad Óptica (DO) de las muestras y el valor de corte (Co/M)

Co/muestra	Interpretación
< 0.9	Negativo
0.9 – 1.1	Equívoco
> 1.1	Positivo

- Un resultado negativo significa que el paciente no está infectado por el VHD.
- Un resultado equívoco debe ser repetido o tomada una segunda muestra después de 1-2 semanas de haber tomado la primera muestra.
- Un resultado positivo indica una infección por el VHD y el paciente debe ser tratado.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.3. Técnicas moleculares

#### IV.3.1. Extracción de ARN, transcripción reversa y amplificación mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RCP-TR).

El ARN fue extraído a partir de 140  $\mu$ L de suero usando el juego comercial QIAamp RNA mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Al ARN extraído se le realizó una transcripción reversa (TR) según protocolo de Andernach y colaboradores en 2014 [178]. Se utilizó el juego de reactivos comercial Super-Script III First Strand Synthesis (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). La TR fue realizada en un volumen final de 20  $\mu$ L con las siguientes características en la Tabla IV.2:

*Tabla IV.2. Mezcla para realizar la Transcripción reversa del ARN del VHD.*

Random Hexamers 50 ng/ $\mu$ l	5 $\mu$ l
Mezcla dNTP (10 mM)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	2 $\mu$ l
total	8 $\mu$ l
ARN	5 $\mu$ l
total	13 $\mu$ l
<b>Desnaturalización a 72°C, 5 min. y pasar rápidamente a hielo</b>	
5X first-strand buffer	4 $\mu$ l
DTT 0.1 M	1 $\mu$ l
RNase OUT (40 U/ml)	1 $\mu$ l
SuperScript III (200U)	1 $\mu$ l
total	7 $\mu$ l
<b>TOTAL (en el tubo)</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

La TR final fue realizada a 50°C durante 80 min. y luego inactivación por calor de la reacción a 70°C durante 15 min. Se obtuvo un ADN complementario (ADNc) al ARN del VHD.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para amplificar el genoma del VHD se utilizó el protocolo previamente descrito por Le Gal y colaboradores en 2005 [179]. Los cebadores y la sonda utilizados fueron diseñados teniendo en cuenta la variabilidad genética del VHD. El cebador sentido amplifica la región de la riboenzima, y el cebador antisentido tiene como diana la región I de la riboenzima del antígenoma. La sonda hibrida la misma región que el cebador antisentido, y fue diseñada para reforzar la secuencia del antígenoma y evitar la combinación de bases con el cebador antisentido. Los nombres y secuencias de los cebadores y la sonda se describen a continuación en la Tabla IV.3. En la Tabla IV.4 se muestra el programa utilizado.

*Tabla IV.3. Sonda y cebadores para la RCP-TR del VHD.*

<b>Secuencia (5' → 3')</b>		<b>Orientación cebadores</b>	<b>Sitio unión en el genoma VHD</b>
Delta-F	GCATGGTCCCAGCCTCC	Sentido	691–707
Delta-R	TCTTCGGGTCCGGCATGG	Anti-sentido	905–889
Delta-P	FAM-ATGCCCAGGTCGGAC-MGB		856–870

FAM: 6-carboxyfluoresceina (fluorocromo donador), MGB: minor groove binder (fluorocromo aceptor), Delta-F: cebador sentido, Delta-R: cebador antisentido, Delta-P: sonda.

Se utilizó como Control Positivo (CP) el primer estándar internacional de la OMS del ARN del VHD para ensayos de amplificación de ácidos nucleicos, procedente del Instituto Paul-Ehrlich en Alemania. Dicho estándar ha sido preparado usando una cepa de VHD de genotipo 1, derivado de un plasma humano positivo a VHD y luego diluido en plasma humano negativo [180]. Se utilizó la mezcla universal para sondas de hidrólisis (Taqman Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, EU). La concentración de los cebadores sentido y antisentido en la mezcla fue de 0.5  $\mu$ M y la sonda a 2.5  $\mu$ M. El volumen final fue 25  $\mu$ L en cada tubo de 0.2  $\mu$ L. La mezcla con sus respectivos controles (agua libre de ARNasas como control negativo) y las muestras, fue colocada en el equipo Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49 (Qiagen).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla IV.4. Programa de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para detectar el ARN del VHD.

Parámetros		T° (°C)	Tiempo (hr:min:seg)
Activación de la Taq polimerasa		95	00:10:00
Amplificación (50 ciclos)	Desnaturalización	95	00:15:00
	Hibridación	60	00:01:00

T: tiempo, hr: horas, min: minutos, seg: segundos

### IV.4. Otros ensayos serológicos utilizados en la presente investigación

- **HBsAg** (UMELISA HBsAg, CIE) [181, 182]
- **HBsAg confirmatorio** (UMELISA HBsAg confirmatory, CIE) [181]
- **IgM anti-HBc** (UMELISA anti-HBc, CIE) [181]
- **Anti-HBc totales** (UMELISA anti-HBc totales, CIE) [181]
- **Detección de HBeAg/anti-HBe** (Juego comercial DIAsource Immunoassay (ELISA), Bélgica).
- **Carga viral VHB** (RCP en tiempo real) [183]

### IV.5. Consideraciones Éticas

Las muestras de suero fueron colectadas por personal calificado y entrenado de las principales consultas de Gastroenterología y en hospitales o clínicas para diagnóstico molecular de la hepatitis B o para la vigilancia del VHB en el marco del Programa Nacional de Control y Prevención de las Hepatitis Virales. Directamente

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

después de recibir la muestra por el Laboratorio de Referencia Nacional para las Hepatitis Virales, un único número de identificación fue colocado y subsecuentemente usado para todos los análisis. Una vez concluido su procesamiento, las muestras fueron debidamente almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso. La información de dichas muestras está contenida en bases de datos del laboratorio, el cual tiene acceso solamente el personal del LNRHV y no se usó para otros fines que el propuesto. Los resultados positivos referentes al VHD serán notificados al médico de asistencia para su correcto tratamiento y seguimiento. La investigación **Hepatitis Delta en Cuba** es un Proyecto Asociado a Programa que fue aprobado por el Comité de Ética del IPK de acuerdo con la Declaración de Helsinki (número CEI-IPK 05-16) (Anexo 7).

En caso de seguimiento y revisión de Historias Clínicas de pacientes positivos a VHD, se tomó el Consentimiento Informado firmado por el paciente y el médico a cargo, previa explicación del estudio (Anexo 8).

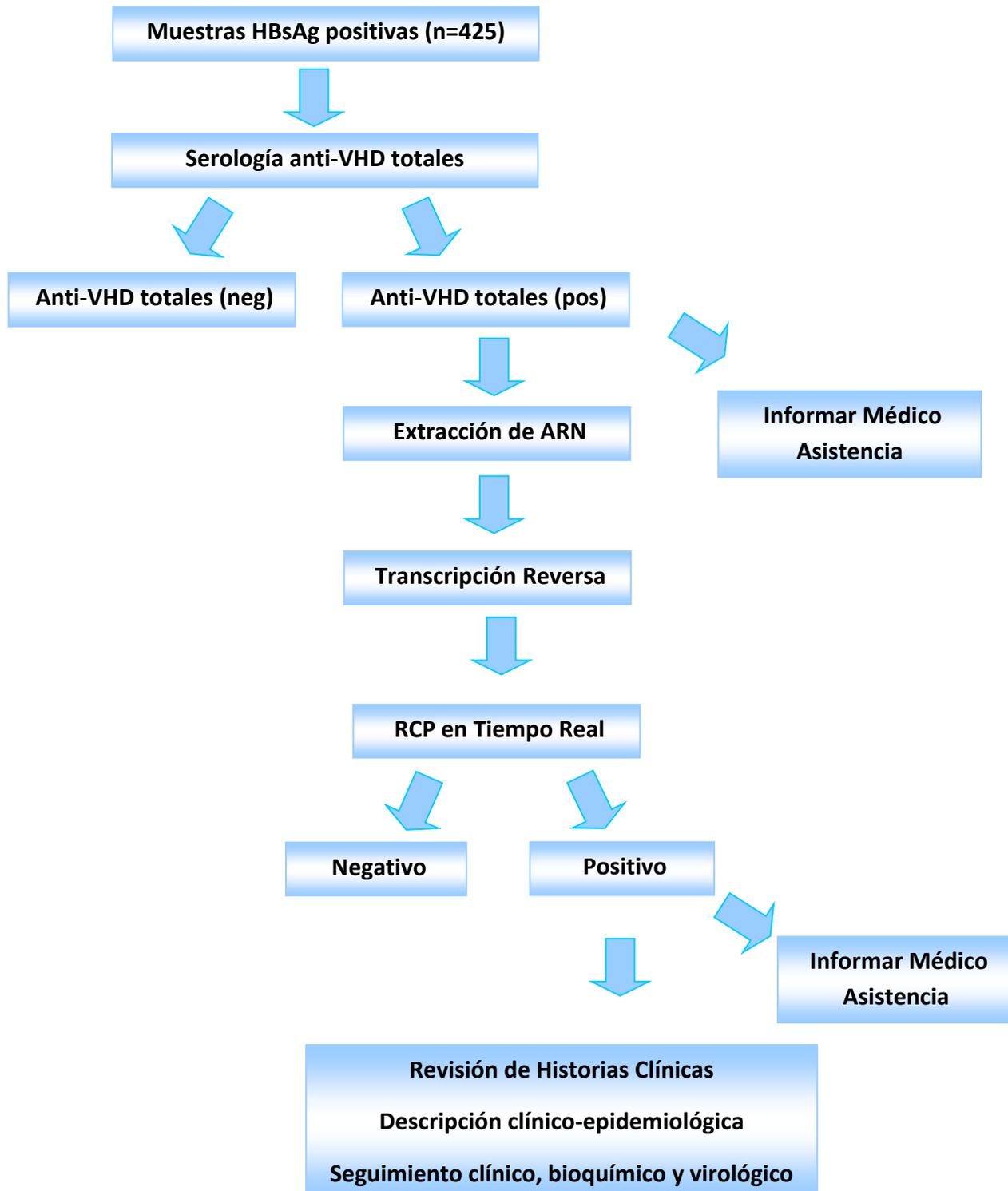
### IV.6. Análisis estadístico

Para el análisis de la información se confeccionó una base de datos en Microsoft® Office Excel 2010. Los resultados fueron presentados en forma de tablas, gráficos y porcentajes. El análisis estadístico fue realizado con la prueba Chi-cuadrado y los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando la  $p < 0.05$  (ver diagrama de flujo de trabajo).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### IV.7. Diagrama de flujo.

Para una mejor comprensión se muestra un diagrama de flujo que resume la estrategia seguida en cada ensayo.



## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Prevalencia de la infección por el VHD en individuos cubanos positivos al HBsAg.

Se analizaron 425 muestras de suero con HBsAg positivo confirmado que fueron tomadas de pacientes con enfermedades hepáticas en estudio o como parte de la vigilancia de hepatopatías por VHB, recibidos en el LNRHV en el periodo 2006-2011 y 2014-2018. Dos muestras resultaron positivas a anticuerpos anti-VHD totales para un 0.47% (2/425). En la Tabla V.1 se presentan los resultados en relación con el año de colecta de las muestras.

*Tabla V.1. Positividad a anticuerpos totales al VHD en individuos cubanos portadores del HBsAg, 2006-2018.*

<b>Años de colecta de muestras</b>	<b>N</b>	<b>Positivos a anti-VHD</b>	<b>%</b>
<b>2006</b>	2	0	0
<b>2007</b>	2	0	0
<b>2008</b>	9	0	0
<b>2009</b>	6	0	0
<b>2011</b>	1	0	0
<b>2014</b>	37	0	0
<b>2015</b>	100	1	1
<b>2016</b>	92	0	0
<b>2017</b>	143	1	0.7
<b>2018</b>	33	0	0
<b>Total</b>	<b>425</b>	<b>2</b>	<b>0.47</b>

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia en Hepatitis Virales, IPK

Las dos muestras que resultaron positivas fueron caracterizadas desde el punto de vista demográfico, epidemiológico y virológico. En cuanto a la caracterización virológica se analizaron otros marcadores del VHB y los anticuerpos anti-VHC,

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

este último por la similitud de las vías de transmisión. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla V.2.

*Tabla V.2. Características demográficas, epidemiológicas y marcadores de los VHB y VHC de los individuos positivos a anti-VHD totales.*

Muestra	Edad	Sexo	Antecedente epidemiológico	Anti-HBc totales	IgM anti-HBc	HBeAg	Carga viral VHB	Anti-VHC
1	57	M	Desconocido	P	P/P	N	ND	N
2	53	M	Múltiples parejas sexuales. No viajes al exterior	P	P/BL	N	ND	N

M: masculino; P: positivo; BL: limítrofe; ND: no detectable; N: negativo

Fuente: Laboratorio Nacional de Referencia en Hepatitis Virales, IPK

La prevalencia del VHD en una población es la medida de los anti-VHD entre los portadores del HBsAg. Se ha estimado que 10-20 millones de individuos (~5% de los pacientes infectados crónicamente con el VHB) a nivel mundial están coinfectados con el VHD. Esta prevalencia lógicamente varía de una zona geográfica a otra. Estudios en los años 80 demostraron que el VHD estaba distribuido mundialmente, y que su prevalencia local estaba condicionada por la prevalencia del VHB [184]. Sin embargo, aunque el VHD está solapado con el VHB, su prevalencia no siempre coincide con la del VHB. Por ejemplo, en el Lejano Oriente las tasas de VHD son bajas en comparación con el VHB. Las variaciones en la penetración del VHD en las poblaciones con HBsAg pueden estar determinadas por diferencias en el comportamiento social local, la virulencia del VHD o la susceptibilidad genética del portador [184].

La prevalencia de anticuerpos anti-VHD encontrada en nuestro estudio fue baja, en Cuba existen pocos estudios en referencia al VHD, se destaca un estudio realizado hace 30 años por Galbán y cols. en 1988, donde se estudiaron 856

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

sueros procedentes de todo el país, a los cuales se les determinó la presencia de anticuerpos al VHD mediante un ELISA de la firma Organon Teknika, Bélgica [27]. El 8,3% de los sueros procesados resultó positivo. Se observa una diferencia ostensible en ambos estudios, que puede estar relacionado con la estrategia de Prevención y Control del VHB llevada a cabo por nuestro país a partir del año 1992. A partir de esta fecha, Cuba no solo comenzó la vacunación universal a los recién nacidos, sino que vacunó a todos los grupos de riesgo y creó un Programa de Prevención y Control de las hepatitis virales y un Programa de Sangre Segura con resultados satisfactorios. En la Figura V.1 se muestra la incidencia del VHB en el periodo 1990-2016, donde se observa una disminución de la tasa de 16.7/100.000 en 1990 a 0.5/100.000 habitantes en 2016 y su relación con la prevalencia a anti-VHD en los dos estudios realizados en población cubana positiva al HBsAg, en 1988 y el presente estudio 2006-2018.

Es de suponer que los resultados de la disminución de la prevalencia del VHD en 30 años podrían deberse a dicha estrategia, ya que es precisamente la vacunación contra el VHB la vacunación por defecto del VHD, resultando en el decrecimiento de la prevalencia del VHD. En países industrializados con la implementación de la vacunación rutinaria en niños y en otras poblaciones se ha logrado este impacto [185].

Se ha postulado que la hepatitis delta juega un importante papel en el control y la diseminación del VHB. Aumentando los programas existentes de monitoreo del VHB con el monitoreo del VHD, se podría incrementar la precisión de la prevalencia del VHB y la eficacia de los programas de control [186].

Se ha especulado que en dependencia de la cobertura de vacunación anti-hepatitis B, se produce un equilibrio entre la prevalencia del VHB y el VHD. El VHB y el VHD serían erradicados si la cobertura de vacunación es muy alta, si la cobertura es moderada solo permanecerá el VHB y si la cobertura es baja, permanecerán ambos virus en la población. La prevalencia del VHB en una población mono infectada será igual o mayor que los niveles de prevalencia donde

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

los dos virus existen, como resultado de la supresión de la infectividad del VHB por el VHD en los individuos dualmente infectados [187].

En la Figura V.1 se observa que existe un paralelismo entre la incidencia del VHB y la positividad a anti-VHD obtenida en los dos estudios realizados en Cuba con 30 años de diferencia, lo que nos lleva a afirmar que Cuba además de ser un país de baja prevalencia del HBsAg, es un país de baja prevalencia de VHD y que ambos virus podrían tener una fecha de eliminación similar si continuamos con la estrategia antes mencionada. Dichos resultados aportan datos valiosos a la eliminación no solo del VHB, sino también a la eliminación del VHD.

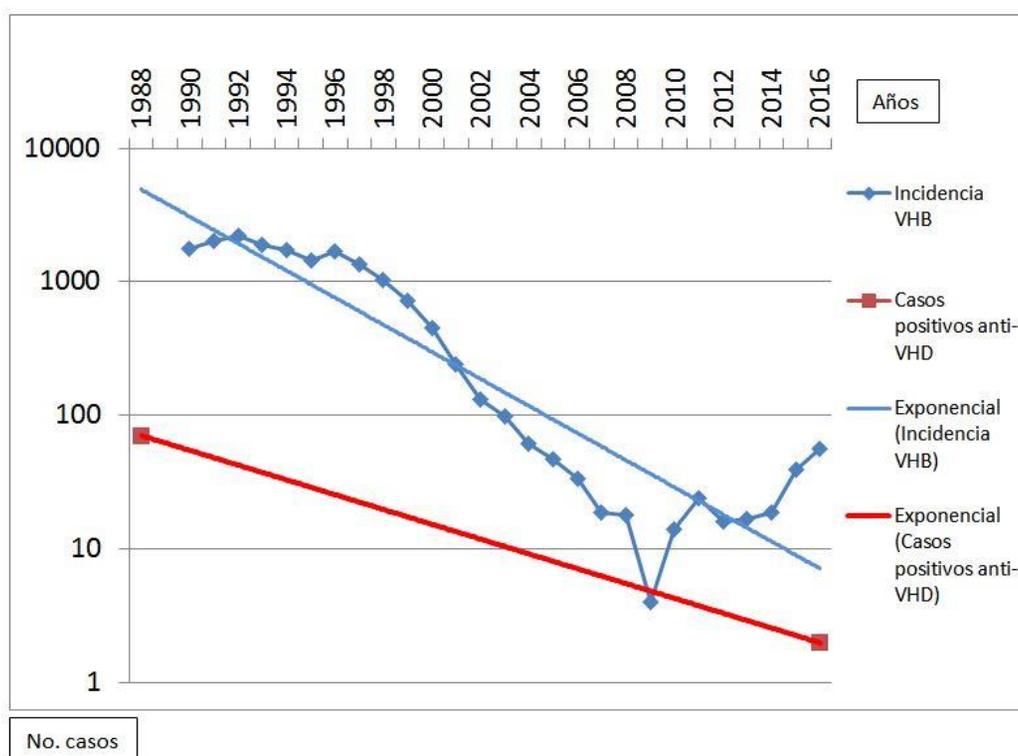


Figura V.1. Incidencia de la infección por el VHB, Cuba 1990-2016 y su relación con la positividad a anti-VHD en dos estudios realizados en población cubana positiva al HBsAg: 1988 y 2006-2018. Datos de la incidencia del VHB en Cuba recogido en los Anuarios Estadísticos de Cuba y Dirección Nacional de Epidemiología.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Datos confiables acerca de la prevalencia de VHD no están disponibles en muchas partes del mundo, debido a la falta de análisis de portadores del VHB para buscar infección por el VHD o por la falta de disponibilidad de ensayos de detección de anticuerpos anti-VHD con un desempeño probado [185].

El escenario de la infección por el VHD ha cambiado en los países industrializados en los últimos 20 años por la vacunación anti-hepatitis B, la mejoría en las condiciones sanitarias y de vida, las restricciones sexuales impuestas por el riesgo de infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), entre otras. Esta disminución está en dependencia de la edad, disminuyendo en los jóvenes, pero no en los mayores [13, 188].

A finales del siglo pasado, la disminución del VHD en Europa permitió concluir de que ya no era una enfermedad médica relevante (fue catalogado como virus huérfano u olvidado) [162, 189, 190]. Sin embargo, el VHD no se ha desvanecido de Europa, sino que ha aumentado debido a la inmigración de personas de áreas donde el VHD es endémico [191]. En un estudio realizado en Italia la prevalencia de anti-VHD fue de 8.4% (7.4% en italianos y 11.5% en inmigrantes) [192]. En Alemania del 8%–10% de los pacientes con HBsAg-positivo tienen anticuerpos anti-VHD, el 75% de ellos provenientes de Turquía, Europa del Este y la Antigua Unión Soviética [13]. En los años 2000–2006 en el sur de Londres, la prevalencia de anti-VHD fue de 8.5% [162]; donde la mayoría de los pacientes provenían de África y Europa del Este. En Francia la prevalencia al VHD se ha incrementado en los últimos 15 años en los donantes de sangre siendo los inmigrantes africanos los más afectados [193]. Los inmigrantes también son los más afectados en Grecia [188]. El VHD está además presente en otros países del norte de Europa, pero confinado a los grupos de riesgo con una prevalencia de aproximadamente 5% en Austria, Irlanda, Polonia, Bélgica, República Checa y Suiza [184, 194]. En España, se compararon 2 períodos, 1979-1985 y 1986-1992, con una prevalencia de anti-VHD del 15,1% y 7,1% respectivamente [195]. Países de Europa del Este como Rusia, un estudio encontró un 39% de positividad al VHD, también en la región Central y Norte de Siberia los marcadores del VHD fueron detectables en el 18 al

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

20% de los portadores del VHB, indicando un alto nivel de endemidad [16, 138, 196].

En África se han reportado prevalencias elevadas fundamentalmente en el Centro y Occidente notificándose prevalencias del VHD del 47.3% en Somalia, 24.3% en Egipto, y 8.1% Arabia Saudita [147, 184]. En 2009, fue reportada una prevalencia de 66.7% en Gabón, 17.6% en Camerún, 12.5% en Nigeria, llegando a 50% en la Republica Centro Africana [178, 197-199]. En Mauritania la prevalencia es de 33.1% entre pacientes HBsAg positivos y 14.7% en mujeres embarazadas [200, 201].

Estudios en Medio Oriente y algunas zonas de Asia donde la infección es endémica, encontraron que en Irán, la prevalencia varia de 2.4% en donantes de sangre a 10% en pacientes con enfermedad crónica del hígado. En portadores asintomáticos del HBsAg de Jordania, Kuwait, Arabia Saudita, y Turquía la prevalencia es de 2%, 31%, 3.3%, 5.2%, respectivamente. La prevalencia en pacientes con hepatitis aguda de Egipto, Jordania, Kuwait y Tayikistán, es de 16.9%, 16%, 4% y 9.2%, respectivamente. En enfermedad hepática crónica de pacientes de Yemen, Turquía, Jordania, y Egipto, es de 2%, 32.7%, 23% y 23.5%, respectivamente [202].

En el Sur de Asia, la mayoría de los países tienen condiciones que son favorables para la diseminación del VHB e infecciones relacionadas: ausencias de estrategias defensivas contra dichas infecciones, pobreza extrema y persistente, áreas densamente pobladas y deterioro de la infraestructura de salud pública y de la educación [203]. Se ha encontrado una prevalencia del VHD de un 16.6% en Pakistán, siendo en áreas rurales más elevada. En la India la tendencia es diferente y ha ido cambiando con el tiempo, zona y según el grupo estudiado, se reportan prevalencias de 10.6% in 2005 en Nueva Delhi, en Mumbai, de acuerdo a un estudio realizado en 1992, la prevalencia fue de 37.4% y en Ludhiana se reportó un 33% en niños [203].

Mongolia exhibe una prevalencia tan alta como 60 a 82% en los pacientes positivos al HBsAg y enfermedad hepática avanzada [204-206]. En China, la

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

prevalencia varía por zonas geográficas, 13% en Shijiazhuang, 0.15% en Hong Kong, 13.15% en Shandong, 15.3% en Taiwán y 2.22% en Wuhan, este último en drogadictos por vía endovenosa [188, 203, 207]. En Japón ciertas áreas son de elevada prevalencia especialmente las Islas Mikayo en Okinawa con un 23.5% en 1995 y 8.5% en 2000 [203, 208].

Un estudio reciente de la región del Pacífico encontró elevadas prevalencias (37%) en las Islas de Micronesia [209]. Sin embargo, el VHD parece ser de baja prevalencia en la población general de Malasia, Tailandia y Filipinas, y más elevado en drogadictos de Malasia y Tailandia (20%–34% y 21.8%, respectivamente) [210, 211]. El VHD es endémico en el norte de Vietnam; el ARN fue encontrado en el 13% de los portadores del VHB, siendo el grupo de Cirrosis hepática el de mayor positividad (19.7%) [212].

Países de la Región de las Américas donde la prevalencia del VHB es baja como EEUU, se detectó un 8% de prevalencia en California, con una relativa alta frecuencia de individuos positivos al VHD de descendencia asiática, mientras que en veteranos estadounidenses solo un 3.4% [213, 214].

La Amazonía Occidental incluyendo Brasil, Perú, Ecuador, Venezuela y Colombia, representa uno de los lugares de mayor prevalencia de infección por el VHD en el mundo [175]. Aunque Brasil no es un país de alta prevalencia del VHD, sí la región de Amazonas se ha considerado como endémica. En esta región el genotipo 3 del VHD ha sido asociado con la Fiebre de Labrea, la cual es una forma de hepatitis fulminante que afecta la población indígena [22]. Las tasas de positividad oscilan entre 8.5% en los donantes de sangre asintomáticos, hasta 65% en un estudio realizado a nivel hospitalario [175]. Se plantea que el 77% de las infecciones por el VHD, ocurren en el Norte del país [143, 215, 216].

Elevadas prevalencias también se reportan en la Amazonía Venezolana y Colombiana, donde la infección causada por el genotipo 3 está asociada con brotes de hepatitis fulminante [217]. En Colombia marcadores serológicos y/o moleculares de infección por el VHD fueron demostrados en el 43.5 % de las

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

muestras provenientes de Amerindios [218]. En Venezuela se reportó casos de hepatitis severa ocasionada por el VHD en la población indígena rural, donde la infección por el VHB es endémica [216, 219].

En Perú, el análisis de marcadores del VHD demostró un 64% de infecciones duales VHB y VHD [139]. En Ecuador, se ha reportado un brote de hepatitis delta en una comunidad originaria, donde el 69% fueron niños y mayormente super-infecciones [220].

En Argentina, un estudio de prevalencia en donantes de sangre, detectó 4 casos de infección por el VHD pertenecientes al genotipo 1, tres de ellos en una comunidad amerindia [221]. Otros países de Latinoamérica y el Caribe como México reportan 0% en prisioneros o en hemodializados de Jamaica [222, 223]. Igualmente un estudio seroepidemiológico en diferentes grupos poblacionales bolivianos no encontró anticuerpos positivos al VHD [224].

El VHB y el VHD comparten las mismas vías de transmisión: parenteral a través de la exposición a la sangre o los fluidos corporales y la sexual, particularmente en población de alto riesgo. Se constató transmisión parenteral inaparente en áreas de elevada endemicidad donde la diseminación intrafamiliar es común [225].

Galbán y cols. en su estudio de 1988, encontraron que los mayores porcentajes se encontraron en las provincias Santiago de Cuba (35,3%), Granma (20,0%) y en el municipio especial Isla de la Juventud (33,3%). En el presente estudio realmente es difícil comparar ya que la positividad es baja, ambos pacientes provenían de hospitales de la Habana y al menos uno de ellos es oriundo y ha vivido toda su vida en La Habana. Igualmente en el estudio anterior realizado en Cuba, el sexo femenino (10,2%) tuvo mayor seropositividad que el masculino y el grupo de edad con mayor positividad fue el de 25 a 34 años (10,4%), resultando el de menor positividad el grupo de 45 a 54 años (3,2%). En nuestro estudio los dos pacientes con serología anti-VHD eran del sexo masculino y mayores del grupo de menor positividad reportado por Galbán y cols. [27].

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El modo de transmisión del VHD es por exposición percutánea (drogadictos por vía endovenosa, EV) y por exposición por mucosas (contacto sexual). Tradicionalmente, se ha buscado esta infección en individuos de alto riesgo y en aquellos con enfermedad hepática avanzada. Estos incluyen: individuos trabajadores del sexo, drogadictos por vía EV, pacientes en hemodiálisis, y aquellos que reciben productos sanguíneos (múltiples transfusiones y hemofílicos) [212, 213]. De los dos pacientes del presente estudio que poseían anti-VHD, de uno de ellos no tenemos información al respecto, el otro tenía antecedentes de múltiples parejas sexuales en su juventud, aunque no refiere que alguna de ellas tuviera antecedentes de infección por el VHB, posiblemente adquiriendo ambas infecciones por esa vía, ya que en el momento de inclusión de la vacuna anti-hepatitis B al Programa Nacional de Inmunizaciones en el año 1992, dicho paciente tendría más de 20 años de edad, además no se recoge otro antecedente epidemiológico.

La infección por el VHD puede ser transmitida en forma de coinfección (infección simultánea del VHB y VHD) o como super-infección (adquisición del VHD en un portador crónico del VHB). En caso de trasplante, una tercera forma de adquisición ha sido sugerida: la hepatitis delta independiente de su virus "*helper*" o infección latente aunque es clínicamente irrelevante y de escaso significado virológico [6, 46, 226]. El curso clínico de la infección es diferente en ambos casos. Por tanto, en individuos con serología anti-VHD positiva es crucial distinguir el tipo de infección, ya que el manejo y el pronóstico de ambas es diferente [143].

La IgM anti-HBc que define infección aguda por el VHB, es crucial para la definición de coinfección y superinfección en un paciente con anti-VHD positivo [46]. La IgM anti-HBc estaría ausente en la infección crónica, por tanto, permite distinguir la coinfección aguda VHB/VHD de una superinfección aguda en un portador crónico del VHB o una infección crónica por el VHD ya establecida [226]. En nuestras dos muestras este marcador fue positivo y positivo/límitrofe en el otro. Al no tener elementos en uno de los casos (muestra 1, positivo) no podemos discutir los resultados obtenidos en la serología de la IgM anti-HBc. En la muestra

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2, sí se pudo definir con el médico de asistencia que no se trataba de una infección aguda por el VHB, ya que era un paciente con infección crónica conocida de más de 12 años de evolución. En realidad este paciente según sus características clínicas, bioquímicas y virológicas su médico de asistencia tenía sospecha clínica de infección por el VHD, por lo que estaríamos en presencia de una infección crónica por el VHD ya establecida. Colloredo y cols. en 1996 encontraron valores de IgM anti-HBc significativamente más elevados en el suero de los pacientes con enfermedad inflamatoria severa, y postularon que estos anticuerpos representaban un marcador confiable de enfermedad hepática inducida por el VHB [227]. Por tanto, no estamos en presencia de una coinfección a pesar del resultado positivo de la IgM.

Los marcadores de replicación del VHB: HBeAg y ADN del VHB fueron negativos y no detectables respectivamente en ambos casos, en la caracterización del VHD, se ha planteado que a pesar de la dependencia con el VHB, el VHD suprime la replicación del VHB ya sea en humanos, chimpancés, y en el modelo murino humanizado [225, 228]. Varios autores apuntan que existe una supresión de la replicación del VHB por el VHD, pero con fluctuaciones importantes en la replicación de ambos virus. Un estudio prospectivo realizado en España mostró que durante el periodo analizado, en el 54.5% de los casos predominó la replicación del VHD, en el 30.3% la del VHB y en el 15.2% predominó la replicación de ambos virus [140]. Igualmente se postula que incluso aunque la replicación del VHB se mantenga en niveles bajos, existe daño a nivel hepatocelular [141].

Por otro lado Niro y cols. en Italia han postulado diferentes patrones de replicación del VHB y el VHD (activo VHD/inactivo VHB: 70%, activo VHD y VHB: 23%, inactivo VHD/activo VHB: 4%, ambos inactivos: 3%) [2].

### V.2. Identificar la presencia de replicación viral en las muestras positivas a anti-VHD.

Las muestras que resultaron positivas a anti-VHD fueron posteriormente extraído el ARN, realizado el ADNc y analizadas mediante RCP en tiempo real. En la Figura V.2 se muestra el resultado obtenido. Una de las muestras resultó positiva, mientras que la otra fue no detectable el ARN del VHD (1/2, 50%). Es decir, de los dos pacientes con serología anti-VHD positivo, uno se recuperó de una infección pasada y en el otro se mantuvo con una infección crónica por el VHD.

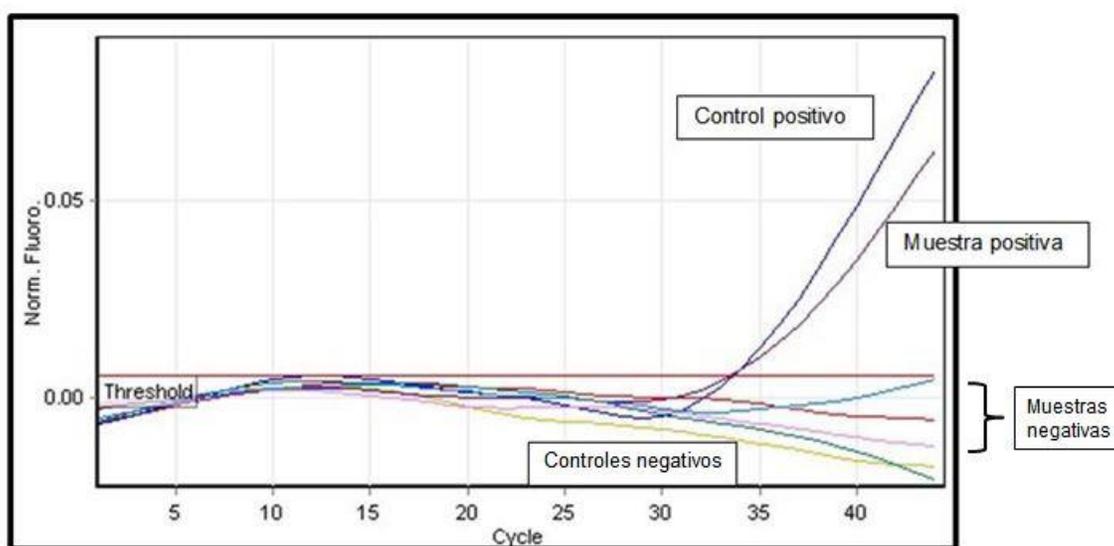


Figura V.2. Detección del ARN del VHD en las muestras positivas a anti-VHD.

En el algoritmo del diagnóstico del VHD, el primer paso lo constituye la detección de anti-VHD (un resultado negativo de anti-VHD no justifica detectar el ARN, ya que hasta el momento, parece que los individuos infectados con el VHD desarrollan siempre anticuerpos), el segundo paso es la detección del ARN del VHD en el suero, para determinar si la presencia de los anticuerpos es reflejo de una infección activa (ARN positivo) o si es la huella de una infección pasada (ARN negativo) [13, 143]. Los anti-VHD estarían presentes después que el ARN haya desaparecido durante la recuperación de la infección.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente la cuantificación de los niveles de ARN VHD en suero no se necesita para el diagnóstico. No existe evidencia entre la correlación de la etapa de la enfermedad hepática y los niveles de ARN. La biopsia hepática es todavía la herramienta principal para evaluar el estadio en los pacientes con hepatitis delta [13, 229]. La carga viral es útil para monitorear la respuesta al tratamiento en los pacientes bajo terapia, desafortunadamente hay pocos datos disponibles sobre los niveles de ARN durante las diferentes etapas de la enfermedad, por tanto, no hay un nivel de corte al cual se pueda recomendar tratamiento [13, 35]. Romeo y cols. en 2014, concluyeron en su estudio que la hepatitis crónica por VHD tiene elevada probabilidad de evolucionar a cirrosis y a cáncer de hígado en Italia y que esta propensión sería más elevada mientras más alta sea la carga viral al momento de presentación de la infección [230].

A diferencia de los VHB y VHC, no existen sistemas de diagnóstico molecular comerciales del VHD en la actualidad. La mayoría de los existentes son técnicas "in-house" desarrolladas en centros académicos, en los cuales la amplificación del VHD muestra retos importantes debido a la variabilidad genómica del virus, el elevado contenido de Guanina y Citosina (GC) del genoma y la complementariedad del ARN [179]. La inclusión de un estándar de RCP recomendado por la OMS como control de calidad internacional ha permitido la comparación de los resultados obtenidos con los diferentes sistemas de RCP [180]. Recientemente Coller y cols. reportaron dos ensayos prototipos serológicos y moleculares altamente sensibles y específicos para la detección del VHD, utilizando plataformas completamente automatizadas para mejorar el diagnóstico de los pacientes infectados por el VHD [231].

Otro aspecto a tener en cuenta en el diagnóstico molecular para reducir los falsos negativos y optimizar la especificidad para todos los genotipos del VHD, es que los cebadores y sondas deben tener como diana las regiones más conservadas, en este caso la riboenzima [232]. El diseño de los cebadores y sonda utilizado en nuestro estudio comprende esta región [179].

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La coinfección VHB y VHD generalmente lleva a la resolución de la infección causada por los dos virus en el 90% de los casos. La progresión a la hepatitis crónica es tan baja como lo es la infección por el VHB en adultos inmunocompetentes. La superinfección del VHD en un portador del VHB puede originar hepatitis aguda o fulminante y aunque algunos pacientes logran recuperarse, del 70 al 90% de ellos progresa a infección crónica por ambos virus. Más importante es que cerca del 60%-70% de esos pacientes desarrollaran cirrosis de progresión más rápida, mostraran elevados signos de descompensación hepática y muerte más elevada que cuando se comparan con la infección por el VHB solamente. Los factores que influyen el curso clínico tan diferentes de ambos casos no está bien comprendido, en ambos casos el organismo produce una fuerte respuesta de anticuerpos anti-antígeno del VHD que es incapaz de modular el curso de la infección. Se ha postulado que el curso más rápido de la superinfección es debido al estado crónico del portador del HBsAg, que hace que el VHD infecte por primera vez un organismo en el cual el mecanismo de producción del HBsAg está establecido y perfectamente funcionando, permitiendo que el ensamblaje de los nuevos viriones de VHD sea más rápido que cuando los dos virus infectan el hepatocito por primera vez [225, 233].

En países donde la infección del VHD es endémica como Irán, el 100% de los pacientes con HBsAg positivo que poseían anti-VHD eran positivos al ARN VHD [234]. El Bouzidia y cols. en 2015 en un estudio multicéntrico en Londres reportaron que en un centro, de 2 pacientes seropositivos a VHD, 2 tenían además ARN positivo, en otro centro 32/158 pacientes con serología positiva, eran además positivos el ARN viral. En el norte de Vietnam donde hay una elevada prevalencia de VHD, se demostró la presencia del genoma en el 15.4% de los sueros analizados, siendo el grupo de hepatitis aguda un 43.3% [235].

Un estudio en Argentina reportó un hallazgo sorprendente en el diagnóstico del VHD, dado que de las 3 infecciones de VHD halladas en amerindios, se observaron en casos de infección oculta por el VHB con serología no reactiva para

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

anti-VHD (infección oculta por el VHD). Los autores puntualizaron la necesidad de reevaluar el algoritmo de diagnóstico del VHD y de explorar si las mutaciones encontradas tenían algún efecto en la patogenia del VHD [221].

### **V.3. Describir los aspectos, clínico-terapéuticos, bioquímicos y virológicos de los pacientes con co-infección por los VHB y VHD.**

En todo paciente con infección por VHD es imprescindible conocer el grado y el estadio de enfermedad hepática para valorar riesgos y beneficios de la terapéutica. La valoración de los parámetros bioquímicos e histológicos y la búsqueda de carcinoma hepatocelular son uno de los primeros acercamientos al pronóstico de la enfermedad. La biopsia hepática continúa siendo el estándar de oro del estadiamiento de la enfermedad, aunque en la actualidad existe tendencia a usar métodos no invasivos como la elastografía hepática o Fibroscan, que es utilizado tanto en el estadiamiento como en el seguimiento de los pacientes con hepatitis B [46].

Solo uno de los dos pacientes encontrados con serología positiva a anti-VHD pudo ser informado de sus resultados, el cuál describimos a continuación.

**Historia de la enfermedad actual:** Es un paciente masculino, de 53 años, que presenta cirrosis hepática compensada en tratamiento con lamivudina por haberse detectado un ADN del VHB positivo en el año 2013, que negativizó 6 meses después pero, sin normalizar las enzimas hepáticas.

**Antecedentes patológicos personales:** Posee antecedentes de infección por el VHB desde el año 1984, momento en que se le diagnosticó un HBsAg positivo por presentar decaimiento y enzimas hepáticas elevadas, se le realizó biopsia hepática con resultado de hepatitis crónica activa. No se describen antecedentes de transfusiones de hemoderivados, no intervenciones quirúrgicas, no salidas al exterior, si refiere la existencia de varias parejas sexuales aunque no se recoge antecedente conocido de pareja sexual con

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

infección por el VHB. En 1985 se indicó tratamiento con interferón alfa 2b recombinante 6 millones 2 veces por semana por 6 meses sin modificación de las enzimas hepáticas durante ni después del tratamiento. En 1986, se indicó un nuevo ciclo de interferón alfa 2b recombinante a partir de lo cual disminuyen las enzimas hepáticas y después continua con picos discretos de mayor aumento de las enzimas hepáticas.

En 2005 comenzó su seguimiento en otro centro hospitalario y en la evaluación clínica el paciente se mantuvo asintomático y se encontró incorporado a una vida laboral normal. Al examen físico se detectó únicamente la presencia de esplenomegalia, que junto con los exámenes de sangre, ecográficos y endoscópicos que se describen a continuación, permitieron estadificar que el paciente presenta una cirrosis hepática compensada por VHB con hipertensión portal, estadio 2 de la clasificación clínica de D'Amico y estadio A según la clasificación de Child- Pugh [236, 237].

En la Figura V.3 se muestra la evolución de las enzimas mostrando un patrón de citólisis: alanino aminotransferasa (ALT) y aspartato aminotransferasa (AST) elevadas y la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) elevada, con fosfatasa alcalina (FA) y la bilirrubina total (BT) normal en el periodo 2005-2017. Se muestra su relación con los resultados ya sea de la RCP cualitativa o de la carga viral del VHB.

Se observa que a pesar de tener todos excepto uno, no detectable el genoma del VHB, no existía una correspondencia con los valores de las enzimas las cuales siempre estaban por encima de valores normales (promedio de los valores en los 13 años: ALT: 117 UI/L, AST: 89 UI/L, GGT: 144 UI/L, FA: 54 UI/L y BT: 19  $\mu\text{mol/L}$ ). En el año 2013 se detectó una carga viral de VHB limítrofe ( $<2.00\text{E}+04$  UI/mL) por lo que se decidió poner tratamiento con lamivudina 1 tab (150 mg) al día, posterior a lo cual no se detecte carga viral pero sin mejoría en su cuadro bioquímico como se observa en la Figura V.3.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

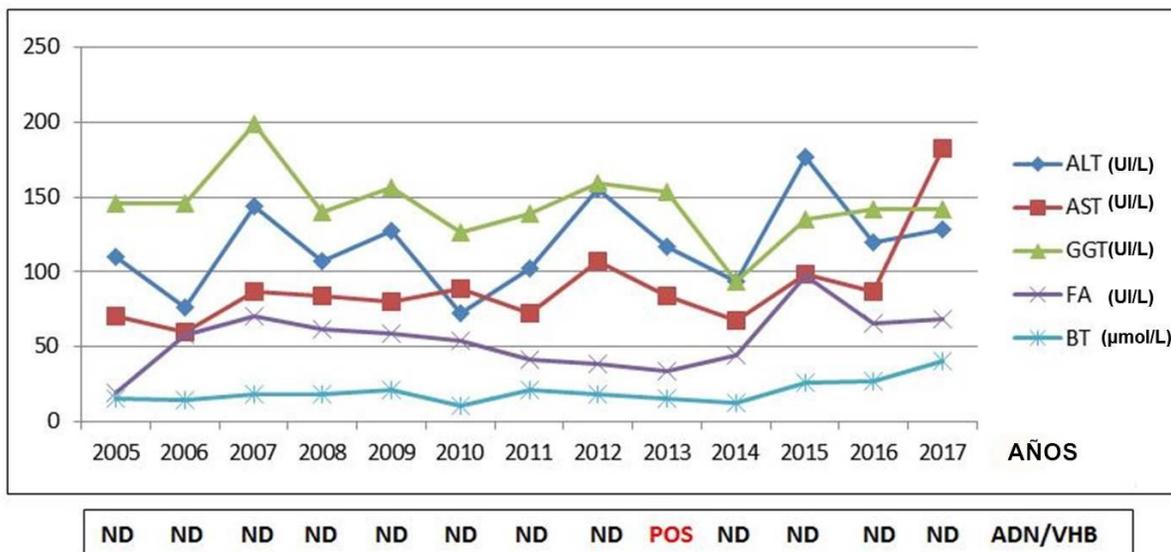


Figura V.3. Evolución de las enzimas hepáticas y la bilirrubina (ALT, AST, GGT y FA y la BT) en el periodo 2005-2017 y su relación con la carga viral del VHB en el paciente coinfectado con los VHB y VHD. El valor anual se corresponde con la media de las determinaciones realizadas en el periodo. Valores normales (ALT: 0-41 UI/L, AST: 0-37 UI/L, GGT: hasta 61 UI/L, FA 40-130 UI/L y BT hasta 18 μmol/L). ND: no detectable, POS: positivo, Fuente: LNRHV, IPK

Otras pruebas que estudian la función hepática (albúmina, proteínas totales, coagulograma, entre otras) se encontraban en valores normales, al igual que la alfa feto proteína que se le realiza cada 6 meses al igual que la ecografía hepática como vigilancia del carcinoma hepatocelular.

En el 2009 dado la persistencia del ADN del VHB con resultados no detectables, se excluyen otras enfermedades hepáticas asociadas como: hemocromatosis (Hierro sérico y ferritina normal), hepatitis autoinmune (electroforesis de proteínas normal, anticuerpos anti-nucleares y anti-músculo liso negativo) y enfermedad de Wilson (ceruloplasmina normal).

En la ecografía hepática, se observa que posee un hígado de ecoestructura granular fina, de bordes regulares, porta de 11 mm, eje esplenoportal de 10 mm, esplenomegalia de 140 mm, no líquido libre, que se ha mantenido así en todos los

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ultrasonidos de control. El estudio endoscópico del tracto digestivo superior realizados en los años 2008, 2011, 2014 y 2018, muestran várices esofágicas grado 1, sin progresión.

En 2017 se realizó el diagnóstico de infección por el VHD y se decidió comenzar tratamiento con interferón pegilado (IFN-PEG) 1 bulbo de 180 µg semanal por vía subcutánea durante un año. Dado que el paciente presenta una cirrosis hepática compensada, toleró el tratamiento sin complicaciones, y como efecto adverso presentó leucopenia que se trató con factor estimulantes de colonias.

En la Figura V.4 se muestra la evolución de las enzimas hepáticas y la bilirrubina (ALT, AST, GGT, FA y la BT), en el periodo de tratamiento con IFN PEG y su relación con la carga viral del VHB y la presencia de ARN del VHD.

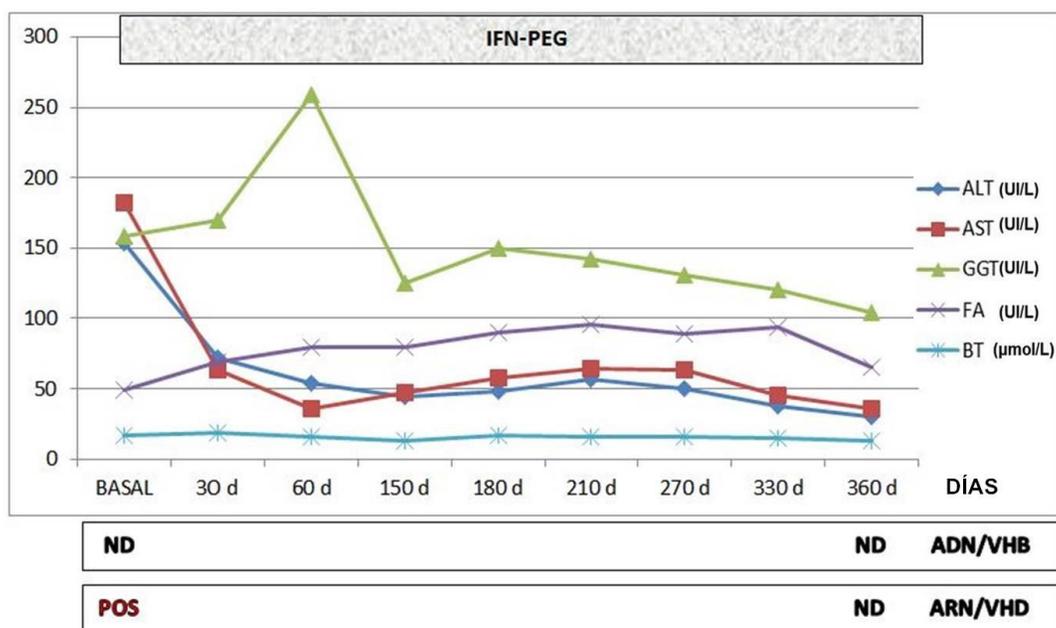


Figura V.4. Evolución de las enzimas hepáticas y la bilirrubina (ALT, AST, GGT, FA y BT) en el periodo de tratamiento con IFN-PEG y su relación con la carga viral del VHB y la presencia de ARN del VHD. ND: no detectable, POS: positivo, Fuente: LNRHV, IPK

Se observa una disminución de las enzimas (promedio de los valores en el año de tratamiento: ALT: 49 UI/L, AST: 51 UI/L y GGT: 130 UI/L, FA: 82 UI/L y BT: 15

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$\mu\text{mol/L}$ ), con tendencia a la normalización de sus valores al final del tratamiento. La comparación del promedio de las enzimas antes y durante el tratamiento se presenta en la Tabla V.3. Se observa que la ALT tiene un valor estadísticamente significativo, no así el resto de las enzimas.

Tabla V.3. Promedio de los valores de las enzimas antes y durante el tratamiento con IFN-PEG.

Enzimas hepáticas	Antes tratamiento INF-PEG (UI/L)	30-360 días post-tratamiento INF-PEG (UI/L)	p
ALT	117	49	$p=0,0500$
AST	89	51	$p>0,05$
GGT	144	130	$p>0,05$
FA	54	82	$p>0,05$
BT	$19\mu\text{mol/L}$	$15\mu\text{mol/L}$	$p>0,05$

En la Figura V.5 se muestra la detección de ARN del VHD en el paciente 1 año después de ser tratado con IFN PEG. La muestra resultó negativa al ARN del VHD.

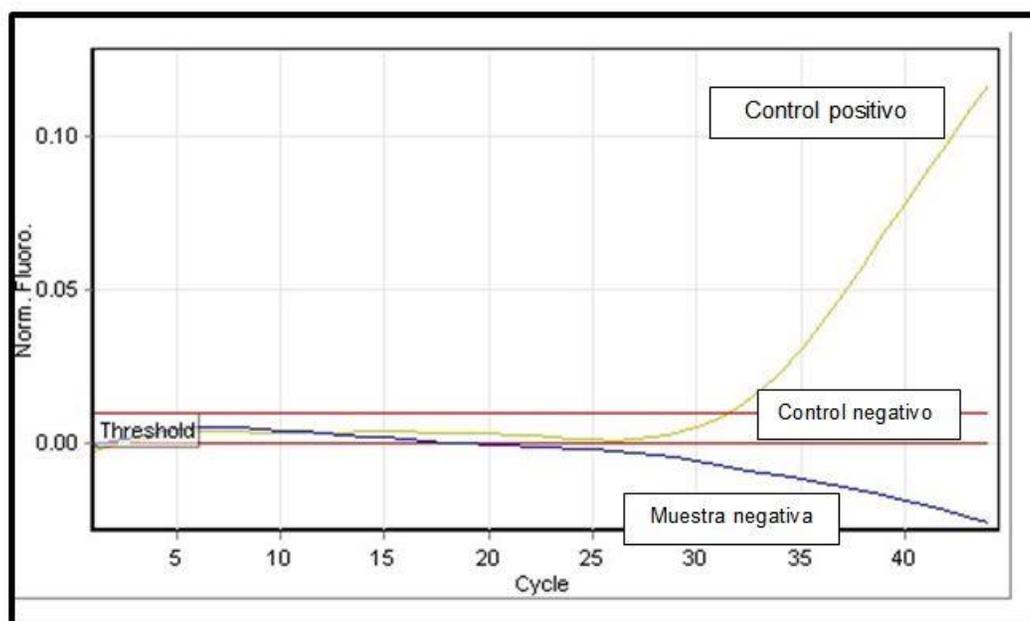


Figura V.5. Detección de ARN del VHD en la muestra un año después de tratamiento con IFN PEG.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el trabajo previo realizado en Cuba en esta temática, se encontró que la mayor positividad era procedente de las muestras de personas asintomáticas, contrario a lo que era de esperar (10,3%) en relación a los enfermos (4,1%), siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) [27]. En el paciente coinfectado VHB/VHD del presente estudio, a pesar de estar asintomático, poseía signos de inflamación y necrosis dados por la alteración bioquímica.

La infección por el VHD está asociado con un amplio rango de manifestaciones clínicas, que van desde los casos asintomáticos hasta la hepatitis fulminante. Se piensa que el espectro clínico de la infección por el VHD puede ser debido a la patogenicidad entre los diferentes genotipos virales. Además, que el genotipo del VHB coinfectante puede jugar un papel importante en el curso de la infección crónica por el VHD [238]. Se ha reportado que el genotipo del VHD-3 está asociado con hepatitis severa y fulminante en el Norte de Suramérica, especialmente cuando se combina con el genotipo F del VHB [22]. El VHD directamente contribuiría a la severidad de la enfermedad hepática, probablemente por inducción de las lesiones citotóxicas [120]. El VHD-2, originalmente aislado en las islas Irabu en Okinawa, Japón, está relacionado con una enfermedad menos severa, ya que la mayoría de los casos raramente presentan alteraciones bioquímicas o lesiones histopatológicas severas [19]. La infección con el VHD-1, el más común encontrado en Norte América y en Europa, es más heterogéneo, está dividido en 2 subgenotipos (1a y 1b) que no son diferentes con respecto a la severidad de la infección y están asociados con ambos: formas severas y leves de la enfermedad [239, 240]. El VHD-4 presente en Japón y Taiwán de China tiene patogenicidad variable, el VHD-4 aislado en Okinawa, Japón, ha sido asociado con mayor progresión a cirrosis que el VHD-4 predominante en Taiwán de China [35]. La caracterización genética por secuenciación nucleotídica del VHD detectable en este paciente, se correspondió con el genotipo 1 (datos no mostrados) que como se recoge en la literatura se asocia tanto a formas severas como leves de la enfermedad.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los síntomas de la infección crónica por el VHD son menos severos que en la infección aguda, mientras que las enzimas ALT y AST están elevadas, la bilirrubina y la albúmina y el tiempo de protrombina son normales [241]. En nuestro paciente se recogen signos de necro-inflamación dados por el aumento mantenido de las enzimas ALT, AST y GGT, con el resto de las pruebas funcionales hepáticas normales, ya que el paciente presenta una cirrosis hepática compensada con función de síntesis conservada.

Sy y cols. en el 2013 encontraron valores significativamente elevados de las enzimas de citólisis hepatitis en pacientes con enfermedad crónica del hígado, cuando comparo las muestras VHD positivas y VHD negativas [235]. Liao y cols. por su parte cuando estratificó a sus pacientes con hepatitis delta crónica por el valor de la ALT encontró que el 46.7%, 56.5% y 80.5% de esos pacientes poseían necro inflamación significativa y 86.7%, 87.0% y 90.3% tenían fibrosis significativa con valores de ALT de 1–2 veces por encima del valor normal, 2–5 veces y más de 5 respectivamente. La ALT tuvo un valor promedio de 152 y la AST de 145 [242]. En cuanto a la fibrosis, el mayor porcentaje de los pacientes (88.6%) tuvo  $\geq$  F2.

En el estudio reportado por Ghamari y cols. todos los pacientes con un HBsAg positivo y HBeAg negativo tenían valores de ALT y AST medios de 38.44 (UI/L) y 30.79 (UI/L), respectivamente. Sin embargo, en pacientes con resultados positivos para VHD, el valor medio de la ALT fue 88.30 (UI/L) y 74.8 para la AST (UI/L), más bajos que los obtenidos en el presente estudio. Igualmente los pacientes tenían cargas virales muy bajas o moderadas al VHB similar a nuestro hallazgo [234].

El paciente del presente estudio, como se ha citado anteriormente, lleva tratamiento con lamivudina y a partir del diagnóstico de VHD recibió IFN-PEG durante un año, tuvo una disminución de las enzimas de citólisis ALT y AST con tendencia a la normalización, no así la GGT que siempre se mantuvo en valores sobre los 100 UI/L, relacionado con la cirrosis que presenta, ya que la GGT es un marcador de fibrosis [243].

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez concluido el tratamiento con IFN-PEG, el ARN del VHD no fue detectable (Figura V.3). El VHD es un satélite del VHB y no puede replicarse sin su ayuda, por tanto, se espera que una cura para el VHB pudiera concomitantemente llevar al aclaramiento del VHD. Actualmente los pacientes coinfectados con ambos virus deben ser tratados con análogos de nucleótidos y con IFN-PEG. El INF-PEG es el primer tratamiento de elección en los pacientes con infección crónica por el VHD, por 1 año tanto para aquellos que son vírgenes de tratamiento, como para los no respondedores al IFN estándar. Pero el éxito de estos tratamientos es bajo, y solamente el 25% de los pacientes tienen niveles indetectables de ARN del VHD 24 semanas después de cesar el tratamiento [244, 245]. De ahí que el manejo actual este basado en la práctica más que en la evidencia de los ensayos clínicos. Por tanto, la terapia debe ser pragmática e individualizada basándose en la respuesta clínica y virológica durante la terapia [240].

La respuesta al tratamiento puede ser predicha por la evaluación del ARN del VHD a los 6 meses de tratamiento, lo cual nos da una idea de cuando parar el tratamiento. Los pacientes con ARN negativo a los 6 meses son más probables que tengan respuesta virológica sostenida, mientras que los no respondedores se identifican cuando la disminución del ARN es de menos de 3 log a los 6 meses de tratamiento. El IFN-PEG alfa 2a o 2b, parecen ser igualmente efectivos [153, 246, 247].

Otras terapias reportadas para el VHD son el Myrcludex B, el cual compite con el virión infeccioso por la unión al receptor, el Lonafarnib, que es un inhibidor de la Farnesyltransferasa el cual inhibe el ensamblaje del virión y los polímeros de ácidos nucleicos, los cuales se unen con alta afinidad a las proteínas anfipáticas que se requieren en varias etapas del ciclo de vida viral, entre otros [245, 248, 249].

En resumen, se detectaron dos pacientes con anti-VHD y solo uno de ellos se encontraba replicando, mostrando un cuadro clínico compatible con una cirrosis compensada y una respuesta favorable a la terapéutica. La obtención de la vacuna recombinante cubana anti-hepatitis B constituye uno de los logros más

## **V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

importantes del desarrollo de la biotecnología en Cuba y uno de los pilares más significativos en los que se basa la Estrategia Cubana de Prevención y Control de la hepatitis B. La disminución de la incidencia y de la prevalencia del VHB en población normal, donantes de sangre y grupos de riesgo es indudable, a esto se añade la disminución significativa de la prevalencia del VHD (8.3% vs 0.47%) 30 años después. Estos resultados se enmarcan en la ejecución del Plan de acción para la prevención y el Control de las hepatitis virales, basado en la Estrategia mundial del sector de la salud contra las hepatitis víricas 2016-2021. Además, plantea un llamamiento a eliminar las hepatitis virales como amenaza de salud pública para el año 2030, para lo cual se debe lograr una reducción de 90% en la incidencia y de 65% en la prevalencia.

## VI. CONCLUSIONES

- La prevalencia de la infección por el VHD en portadores del HBsAg cubanos es baja.
- Los resultados muestran un equilibrio entre la prevalencia del VHB y el VHD, relacionado posiblemente por la estrategia seguida en el Programa de Prevención y Control de la hepatitis B y las elevadas coberturas de vacunación.
- La mitad de los pacientes con anti-VHD positivos tienen replicación viral.
- Un patrón de citólisis se observó en los pacientes coinfectados con VHB y VHD, lo que pudiera estar relacionado con la replicación del VHD.
- Una respuesta virológica efectiva es posible con la administración de antivirales disponibles en el país.

### **VII. RECOMENDACIONES**

- Aumentar el número de muestras a analizar e incluir otros grupos de riesgo.
- Estandarizar un sistema de carga viral para el monitoreo de la terapéutica de los pacientes con hepatitis delta.
- Profundizar en los estudios de epidemiología molecular de las cepas cubanas del VHD circulantes y su relación con la patogenia viral.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Romeo R, Del Ninno E, Rumi M, Russo A, Sangiovanni A, de Franchis R, et al. A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2009;136(5):1629-38.
2. Niro GA, Smedile A, Ippolito AM, Ciancio A, Fontana R, Olivero A, et al. Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: a long-term cohort study. *Journal of hepatology*. 2010;53(5):834-40.
3. Rizzetto M, Ponzetto A, Forzani I. Epidemiology of hepatitis delta virus: overview. *Progress in clinical and biological research*. 1991;364:1-20.
4. Tsatsralt-Od B, Takahashi M, Nishizawa T, Endo K, Inoue J, Okamoto H. High prevalence of dual or triple infection of hepatitis B, C, and delta viruses among patients with chronic liver disease in Mongolia. *Journal of medical virology*. 2005;77(4):491-9.
5. Taylor JM. Virology of hepatitis D virus. *Seminars in liver disease*. 2012;32(3):195-200.
6. Pascarella S, Negro F. Hepatitis D virus: an update. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2011;31(1):7-21.
7. Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90(19):9016-20.
8. Taylor JM. Hepatitis delta virus. *Virology*. 2006;344(1):71-6.
9. Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM. Hepatitis delta virus. *Lancet (London, England)*. 2011;378(9785):73-85.
10. Taylor JM. Chapter 3. Replication of the hepatitis delta virus RNA genome. *Advances in virus research*. 2009;74:103-21.
11. Le Gal F, Gault E, Ripault MP, Serpaggi J, Trinchet JC, Gordien E, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(9):1447-50.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

12. Barros LM, Gomes-Gouvea MS, Pinho JR, Alvarado-Mora MV, Dos Santos A, Mendes-Correa MC, et al. Hepatitis Delta virus genotype 8 infection in Northeast Brazil: inheritance from African slaves? *Virus research*. 2011;160(1-2):333-9.
13. Wedemeyer H, Manns MP. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2010;7(1):31-40.
14. Wu JC, Chen CM, Sheen IJ, Lee SD, Tzeng HM, Choo KB. Evidence of transmission of hepatitis D virus to spouses from sequence analysis of the viral genome. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1995;22(6):1656-60.
15. Imazeki F, Omata M, Ohto M. Heterogeneity and evolution rates of delta virus RNA sequences. *Journal of virology*. 1990;64(11):5594-9.
16. Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *The Journal of general virology*. 2001;82(Pt 11):2709-18.
17. Alvarado-Mora MV, Romano CM, Gomes-Gouvea MS, Gutierrez MF, Carrilho FJ, Pinho JR. Dynamics of hepatitis D (delta) virus genotype 3 in the Amazon region of South America. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2011;11(6):1462-8.
18. Lu SN, Chen TM, Lee CM, Wang JH, Tung HD, Wu JC. Molecular epidemiological and clinical aspects of hepatitis D virus in a unique triple hepatitis viruses (B, C, D) endemic community in Taiwan. *Journal of medical virology*. 2003;70(1):74-80.
19. Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, Kawakami Y, Miyazato S, Kinjo F, et al. Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *Journal of medical virology*. 1999;58(4):366-72.
20. Watanabe H, Nagayama K, Enomoto N, Chinzei R, Yamashiro T, Izumi N, et al. Chronic hepatitis delta virus infection with genotype IIb variant is correlated with progressive liver disease. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 12):3275-89.
21. Hsu SC, Syu WJ, Sheen IJ, Liu HT, Jeng KS, Wu JC. Varied assembly and RNA editing efficiencies between genotypes I and II hepatitis D virus and their implications. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2002;35(3):665-72.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

22. Gomes-Gouvea MS, Soares MC, Bensabath G, de Carvalho-Mello IM, Brito EM, Souza OS, et al. Hepatitis B virus and hepatitis delta virus genotypes in outbreaks of fulminant hepatitis (Labrea black fever) in the western Brazilian Amazon region. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 11):2638-43.
23. Wu JC. Functional and clinical significance of hepatitis D virus genotype II infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;307:173-86.
24. Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, Gault E, Anais P, Drugan T, et al. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades. *Journal of virology*. 2004;78(5):2537-44.
25. Su CW, Huang YH, Huo TI, Shih HH, Sheen IJ, Chen SW, et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology*. 2006;130(6):1625-35.
26. Anuario Estadístico de Salud 2015. Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de salud. La Habana, acceso Jun 1, 2016, disponible en: [http://files.sld.cu/dne/files/2016/04/Anuario\\_2015\\_electronico-1.pdf](http://files.sld.cu/dne/files/2016/04/Anuario_2015_electronico-1.pdf)
27. Galbán E; Rodríguez N; Toledo G; Sotto A; Castañeda C. Encuesta nacional de prevalencia de anticuerpos Delta: Cuba, 1988. *Rev. Cuba. hig. epidemiol*;28(2):141-52, abr. - jun. 1990.
28. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo C, Bonino F, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*. 1977;18(12):997-1003.
29. Rizzetto M, Shih JW, Gocke DJ, Purcell RH, Verme G, Gerin JL. Incidence and significance of antibodies to delta antigen in hepatitis B virus infection. *Lancet (London, England)*. 1979;2(8150):986-90.
30. Rizzetto M, Purcell RH, Gerin JL. Epidemiology of HBV-associated delta agent: geographical distribution of anti-delta and prevalence in polytransfused HBsAg carriers. *Lancet (London, England)*. 1980;1(8180):1215-8.
31. Rizzetto M, Canese MG, Gerin JL, London WT, Sly DL, Purcell RH. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees. *The Journal of infectious diseases*. 1980;141(5):590-602.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

32. Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980;77(10):6124-8.
33. Rizzetto M. The adventure of delta. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2016;36 Suppl 1:135-40.
34. Lai MM. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus. *Journal of virology*. 2005;79(13):7951-8.
35. Alves C, Branco C, Cunha C. Hepatitis delta virus: a peculiar virus. *Advances in virology*. 2013;2013:560105.
36. Gudima S, Chang J, Moraleda G, Azvolinsky A, Taylor J. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *Journal of virology*. 2002;76(8):3709-19.
37. Sureau C. The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;307:113-31.
38. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature*. 1986;323(6088):508-14.
39. Kuo MY, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *Journal of virology*. 1988;62(12):4439-44.
40. Macnaughton TB, Lai MM. Genomic but not antigenomic hepatitis delta virus RNA is preferentially exported from the nucleus immediately after synthesis and processing. *Journal of virology*. 2002;76(8):3928-35.
41. Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, Mason W, Werner B, Gerin J, et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(22):8774-8.
42. Lo K, Hwang SB, Duncan R, Trousdale M, Lai MM. Characterization of mRNA for hepatitis delta antigen: exclusion of the full-length antigenomic RNA as an mRNA. *Virology*. 1998;250(1):94-105.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

43. Hsieh SY, Chao M, Coates L, Taylor J. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *Journal of virology*. 1990;64(7):3192-8.
44. Gudima S, Wu SY, Chiang CM, Moraleta G, Taylor J. Origin of hepatitis delta virus mRNA. *Journal of virology*. 2000;74(16):7204-10.
45. Wu HN, Lin YJ, Lin FP, Makino S, Chang MF, Lai MM. Human hepatitis delta virus RNA subfragments contain an autocleavage activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(6):1831-5.
46. Alfaiate D, Deny P, Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antiviral research*. 2015;122:112-29.
47. Serganov A, Patel DJ. Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nature reviews Genetics*. 2007;8(10):776-90.
48. Riccitelli N, Luptak A. HDV family of self-cleaving ribozymes. *Progress in molecular biology and translational science*. 2013;120:123-71.
49. Wang TC, Chao M. Molecular cloning and expression of the hepatitis delta virus genotype IIb genome. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;303(1):357-63.
50. Makino S, Chang MF, Shieh CK, Kamahora T, Vannier DM, Govindarajan S, et al. Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA. *Nature*. 1987;329(6137):343-6.
51. Glenn JS, White JM. trans-dominant inhibition of human hepatitis delta virus genome replication. *Journal of virology*. 1991;65(5):2357-61.
52. Sheu GT. Initiation of hepatitis delta virus (HDV) replication: HDV RNA encoding the large delta antigen cannot replicate. *The Journal of general virology*. 2002;83(Pt 10):2507-13.
53. Sheu SY, Chen KL, Lee YW, Lo SJ. No intermolecular interaction between the large hepatitis delta antigens is required for the secretion with hepatitis B surface antigen: a model of empty HDV particle. *Virology*. 1996;218(1):275-8.
54. Casey JL, Bergmann KF, Brown TL, Gerin JL. Structural requirements for RNA editing in hepatitis delta virus: evidence for a uridine-to-cytidine editing

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- mechanism. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992;89(15):7149-53.
55. Casey JL, Gerin JL. Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *Journal of virology*. 1995;69(12):7593-600.
  56. Casey JL. RNA editing in hepatitis delta virus. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;307:67-89.
  57. Casey JL. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs. *Current topics in microbiology and immunology*. 2012;353:123-43.
  58. Chao YC, Chang MF, Gust I, Lai MM. Sequence conservation and divergence of hepatitis delta virus RNA. *Virology*. 1990;178(2):384-92.
  59. Chang MF, Baker SC, Soe LH, Kamahora T, Keck JG, Makino S, et al. Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA-binding activity. *Journal of virology*. 1988;62(7):2403-10.
  60. Mu JJ, Wu HL, Chiang BL, Chang RP, Chen DS, Chen PJ. Characterization of the phosphorylated forms and the phosphorylated residues of hepatitis delta virus delta antigens. *Journal of virology*. 1999;73(12):10540-5.
  61. Mu JJ, Tsay YG, Juan LJ, Fu TF, Huang WH, Chen DS, et al. The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis. *Virology*. 2004;319(1):60-70.
  62. Li YJ, Stallcup MR, Lai MM. Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *Journal of virology*. 2004;78(23):13325-34.
  63. Glenn JS, Watson JA, Havel CM, White JM. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science (New York, NY)*. 1992;256(5061):1331-3.
  64. Huang WH, Chen CW, Wu HL, Chen PJ. Post-translational modification of delta antigen of hepatitis D virus. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;307:91-112.
  65. Huang CR, Wang RY, Hsu SC, Lo SJ. Lysine-71 in the large delta antigen of hepatitis delta virus clade 3 modulates its localization and secretion. *Virus research*. 2012;170(1-2):75-84.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

66. Hong SY, Chen PJ. Phosphorylation of serine 177 of the small hepatitis delta antigen regulates viral antigenomic RNA replication by interacting with the processive RNA polymerase II. *Journal of virology*. 2010;84(3):1430-8.
67. Tan KP, Shih KN, Lo SJ. Ser-123 of the large antigen of hepatitis delta virus modulates its cellular localization to the nucleolus, SC-35 speckles or the cytoplasm. *The Journal of general virology*. 2004;85(Pt 6):1685-94.
68. Mu JJ, Chen DS, Chen PJ. The conserved serine 177 in the delta antigen of hepatitis delta virus is one putative phosphorylation site and is required for efficient viral RNA replication. *Journal of virology*. 2001;75(19):9087-95.
69. Chao M, Hsieh SY, Taylor J. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *Journal of virology*. 1990;64(10):5066-9.
70. Williams V, Brichtler S, Radjef N, Lebon P, Goffard A, Hober D, et al. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene. *The Journal of general virology*. 2009;90(Pt 11):2759-67.
71. Wong SK, Lazinski DW. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(23):15118-23.
72. Lee LW, Chang TY, Lo HW, Lo SJ. Hepatitis D antigens cause growth retardation and brood-size reduction in *C. elegans*. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*. 2011;3:380-90.
73. Tavanez JP, Cunha C, Silva MC, David E, Monjardino J, Carmo-Fonseca M. Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA (New York, NY)*. 2002;8(5):637-46.
74. Chou HC, Hsieh TY, Sheu GT, Lai MM. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *Journal of virology*. 1998;72(5):3684-90.
75. Polson AG, Ley HL, 3rd, Bass BL, Casey JL. Hepatitis delta virus RNA editing is highly specific for the amber/W site and is suppressed by hepatitis delta antigen. *Molecular and cellular biology*. 1998;18(4):1919-26.
76. Jayan GC, Casey JL. Increased RNA editing and inhibition of hepatitis delta virus replication by high-level expression of ADAR1 and ADAR2. *Journal of virology*. 2002;76(8):3819-27.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

77. Wang CC, Chang TC, Lin CW, Tsui HL, Chu PB, Chen BS, et al. Nucleic acid binding properties of the nucleic acid chaperone domain of hepatitis delta antigen. *Nucleic acids research*. 2003;31(22):6481-92.
78. Lazinski DW, Taylor JM. Expression of hepatitis delta virus RNA deletions: cis and trans requirements for self-cleavage, ligation, and RNA packaging. *Journal of virology*. 1994;68(5):2879-88.
79. Bichko VV, Khudyakov YE, Taylor JM. A novel form of hepatitis delta antigen. *Journal of virology*. 1996;70(5):3248-51.
80. Sureau C. The use of hepatocytes to investigate HDV infection: the HDV/HepaRG model. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2010;640:463-73.
81. Blanchet M, Sureau C. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *Journal of virology*. 2007;81(11):5841-9.
82. Gripon P, Le Seyec J, Rumin S, Guguen-Guillouzo C. Myristylation of the hepatitis B virus large surface protein is essential for viral infectivity. *Virology*. 1995;213(2):292-9.
83. Le Duff Y, Blanchet M, Sureau C. The pre-S1 and antigenic loop infectivity determinants of the hepatitis B virus envelope proteins are functionally independent. *Journal of virology*. 2009;83(23):12443-51.
84. Julithe R, Abou-Jaoude G, Sureau C. Modification of the hepatitis B virus envelope protein glycosylation pattern interferes with secretion of viral particles, infectivity, and susceptibility to neutralizing antibodies. *Journal of virology*. 2014;88(16):9049-59.
85. Schulze A, Gripon P, Urban S. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2007;46(6):1759-68.
86. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cellular microbiology*. 2008;10(1):122-33.
87. Lamas Longarela O, Schmidt TT, Schoneweis K, Romeo R, Wedemeyer H, Urban S, et al. Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors. *PloS one*. 2013;8(3):e58340.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

88. Sureau C, Salisse J. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus a-determinant. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2013;57(3):985-94.
89. Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, Heydmann L, Weiss A, Renaud M, et al. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis B and D viruses. *Hepatology* (Baltimore, Md). 2016;63(1):35-48.
90. Han Z, Nogusa S, Nicolas E, Balachandran S, Taylor J. Interferon impedes an early step of hepatitis delta virus infection. *PloS one*. 2011;6(7):e22415.
91. Taylor JM, Han Z. Purinergic receptor functionality is necessary for infection of human hepatocytes by hepatitis delta virus and hepatitis B virus. *PloS one*. 2010;5(12):e15784.
92. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*. 2012;1:e00049.
93. Yan H, Peng B, Liu Y, Xu G, He W, Ren B, et al. Viral entry of hepatitis B and D viruses and bile salts transportation share common molecular determinants on sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Journal of virology*. 2014;88(6):3273-84.
94. Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. *Gastroenterology*. 2014;147(1):48-64.
95. He W, Ren B, Mao F, Jing Z, Li Y, Liu Y, et al. Hepatitis D Virus Infection of Mice Expressing Human Sodium Taurocholate Co-transporting Polypeptide. *PLoS pathogens*. 2015;11(4):e1004840.
96. Huang HC, Chen CC, Chang WC, Tao MH, Huang C. Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *Journal of virology*. 2012;86(17):9443-53.
97. Macovei A, Petrareanu C, Lazar C, Florian P, Branza-Nichita N. Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment. *Journal of virology*. 2013;87(11):6415-27.
98. Huang C, Chang SC, Yu IC, Tsay YG, Chang MF. Large hepatitis delta antigen is a novel clathrin adaptor-like protein. *Journal of virology*. 2007;81(11):5985-94.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

99. Chang J, Nie X, Chang HE, Han Z, Taylor J. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *Journal of virology*. 2008;82(3):1118-27.
100. Greco-Stewart VS, Miron P, Abraham A, Pelchat M. The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome. *Virology*. 2007;357(1):68-78.
101. Modahl LE, Lai MM. The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication. *Journal of virology*. 2000;74(16):7375-80.
102. Greco-Stewart VS, Schissel E, Pelchat M. The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerases I and III. *Virology*. 2009;386(1):12-5.
103. Li YJ, Macnaughton T, Gao L, Lai MM. RNA-templated replication of hepatitis delta virus: genomic and antigenomic RNAs associate with different nuclear bodies. *Journal of virology*. 2006;80(13):6478-86.
104. Yamaguchi Y, Filipovska J, Yano K, Furuya A, Inukai N, Narita T, et al. Stimulation of RNA polymerase II elongation by hepatitis delta antigen. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5527):124-7.
105. Cao D, Haussecker D, Huang Y, Kay MA. Combined proteomic-RNAi screen for host factors involved in human hepatitis delta virus replication. *RNA (New York, NY)*. 2009;15(11):1971-9.
106. Huang WH, Yung BY, Syu WJ, Lee YH. The nucleolar phosphoprotein B23 interacts with hepatitis delta antigens and modulates the hepatitis delta virus RNA replication. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(27):25166-75.
107. Beeharry Y, Rocheleau L, Pelchat M. Conserved features of an RNA promoter for RNA polymerase II determined from sequence heterogeneity of a hepatitis delta virus population. *Virology*. 2014;450-451:165-73.
108. Sharmeen L, Kuo MY, Taylor J. Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *Journal of virology*. 1989;63(3):1428-30.
109. Reid CE, Lazinski DW. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(1):424-9.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

110. Watanabe T, Sorensen EM, Naito A, Schott M, Kim S, Ahlquist P. Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(24):10205-10.
111. Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions--report of the ANRS workshop on HBV cure. *Gut*. 2015;64(8):1314-26.
112. Huang C, Chang SC, Yang HC, Chien CL, Chang MF. Clathrin-mediated post-Golgi membrane trafficking in the morphogenesis of hepatitis delta virus. *Journal of virology*. 2009;83(23):12314-24.
113. Hwang SB, Lai MM. A unique conformation at the carboxyl terminus of the small hepatitis delta antigen revealed by a specific monoclonal antibody. *Virology*. 1993;193(2):924-31.
114. Niro GA, Smedile A. Current concept in the pathophysiology of hepatitis delta infection. *Current infectious disease reports*. 2012;14(1):9-14.
115. Ponzetto A, Hoyer BH, Popper H, Engle R, Purcell RH, Gerin JL. Titration of the infectivity of hepatitis D virus in chimpanzees. *The Journal of infectious diseases*. 1987;155(1):72-8.
116. Kamimura T, Ponzetto A, Bonino F, Feinstone SM, Gerin JL, Purcell RH. Cytoplasmic tubular structures in liver of HBsAg carrier chimpanzees infected with delta agent and comparison with cytoplasmic structures in non-A, non-B hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1983;3(5):631-7.
117. Canese MG, Rizzetto M, Novara R, London WT, Purcell RH. Experimental infection of chimpanzees with the HBsAg-associated delta (delta) agent: an ultrastructural study. *Journal of medical virology*. 1984;13(1):63-72.
118. Govindarajan S, Fields HA, Humphrey CD, Margolis HS. Pathologic and ultrastructural changes of acute and chronic delta hepatitis in an experimentally infected chimpanzee. *The American journal of pathology*. 1986;122(2):315-22.
119. Cole SM, Gowans EJ, Macnaughton TB, Hall PD, Burrell CJ. Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1991;13(5):845-51.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

120. Popper H, Thung SN, Gerber MA, Hadler SC, de Monzon M, Ponzetto A, et al. Histologic studies of severe delta agent infection in Venezuelan Indians. *Hepatology* (Baltimore, Md). 1983;3(6):906-12.
121. Lefkowitz JH, Goldstein H, Yatto R, Gerber MA. Cytopathic liver injury in acute delta virus hepatitis. *Gastroenterology*. 1987;92(5 Pt 1):1262-6.
122. Casey JL, Gerin JL. The woodchuck model of HDV infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;307:211-25.
123. Casey JL, Tennant BC, Gerin JL. Genetic changes in hepatitis delta virus from acutely and chronically infected woodchucks. *Journal of virology*. 2006;80(13):6469-77.
124. Fiedler M, Lu M, Siegel F, Whipple J, Roggendorf M. Immunization of woodchucks (*Marmota monax*) with hepatitis delta virus DNA vaccine. *Vaccine*. 2001;19(32):4618-26.
125. Fiedler M, Roggendorf M. Vaccination against hepatitis delta virus infection: studies in the woodchuck (*Marmota monax*) model. *Intervirology*. 2001;44(2-3):154-61.
126. Fiedler M, Roggendorf M. Immunology of HDV infection. *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;307:187-209.
127. D'Ugo E, Canitano A, Catone S, Argentini C, Giuseppetti R, Orobello S, et al. Kinetics of WHV-HDV replication in acute fatal course of woodchuck hepatitis. *Archives of virology*. 2008;153(11):2069-76.
128. Hansson BG, Riesbeck K, Nordenfelt E, Weiland O. Successful treatment of fulminant hepatitis B and fulminant hepatitis B and D coinfection explained by inhibitory effect on the immune response? *Progress in clinical and biological research*. 1991;364:421-7.
129. Hourieux C, Sureau C, Poisson F, Brand D, Goudeau A, Roingeard P. Interaction between hepatitis delta virus-encoded proteins and hepatitis B virus envelope protein domains. *The Journal of general virology*. 1998;79 ( Pt 5):1115-9.
130. de Sousa BC, Cunha C. Development of mathematical models for the analysis of hepatitis delta virus viral dynamics. *PloS one*. 2010;5(9).
131. Kuhla A, Eipel C, Abshagen K, Siebert N, Menger MD, Vollmar B. Role of the perforin/granzyme cell death pathway in D-Gal/LPS-induced

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- inflammatory liver injury. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2009;296(5):G1069-76.
132. Nisini R, Paroli M, Accapezzato D, Bonino F, Rosina F, Santantonio T, et al. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. Journal of virology. 1997;71(3):2241-51.
  133. Farci P, Niro GA. Clinical features of hepatitis D. Seminars in liver disease. 2012;32(3):228-36.
  134. Smedile A, Farci P, Verme G, Caredda F, Cargnel A, Caporaso N, et al. Influence of delta infection on severity of hepatitis B. Lancet (London, England). 1982;2(8305):945-7.
  135. Rizzetto M, Durazzo M. Hepatitis delta virus (HDV) infections. Epidemiological and clinical heterogeneity. Journal of hepatology. 1991;13 Suppl 4:S116-8.
  136. Grabowski J, Wedemeyer H. Hepatitis delta: immunopathogenesis and clinical challenges. Digestive diseases (Basel, Switzerland). 2010;28(1):133-8.
  137. Smedile A, Rizzetto M, Gerin JL. Advances in hepatitis D virus biology and disease. Progress in liver diseases. 1994;12:157-75.
  138. Flodgren E, Bengtsson S, Knutsson M, Strebkova EA, Kidd AH, Alexeyev OA, et al. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. Journal of clinical microbiology. 2000;38(9):3311-6.
  139. Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, McCarthy M, et al. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. The Journal of infectious diseases. 1996;174(5):920-6.
  140. Schaper M, Rodriguez-Frias F, Jardi R, Tabernero D, Homs M, Ruiz G, et al. Quantitative longitudinal evaluations of hepatitis delta virus RNA and hepatitis B virus DNA shows a dynamic, complex replicative profile in chronic hepatitis B and D. Journal of hepatology. 2010;52(5):658-64.
  141. Lozano JL, Crespo J, de la Cruz F, Casafont F, Lopez-Arias MJ, Martin-Ramos L, et al. Correlation between hepatitis B viremia and the clinical and

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- histological activity of chronic delta hepatitis. *Medical microbiology and immunology*. 1994;183(3):159-67.
142. Fattovich G, Giustina G, Christensen E, Pantalena M, Zagni I, Realdi G, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut*. 2000;46(3):420-6.
  143. Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, Dos Santos AO, Salcedo JMV, Vieira DS. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virology journal*. 2017;14(1):177.
  144. Sanchez-Tapias JM, Mas A, Costa J, Bruguera M, Mayor A, Ballesta AM, et al. Recombinant alpha 2c-interferon therapy in fulminant viral hepatitis. *Journal of hepatology*. 1987;5(2):205-10.
  145. Buti M, Esteban R, Roggendorf M, Fernandez J, Jardi R, Rashed R, et al. Hepatitis D virus RNA in acute delta infection: serological profile and correlation with other markers of hepatitis D virus infection. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1988;8(5):1125-9.
  146. Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, Garcia-Lafuente A, Sjogren MH, Esteban R, et al. Clinical significance of two forms of IgM antibody to hepatitis delta virus. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1991;14(1):25-8.
  147. Rizzetto M, Alavian SM. Hepatitis delta: the rediscovery. *Clinics in liver disease*. 2013;17(3):475-87.
  148. Heidrich B, Yurdaydin C, Kabacam G, Ratsch BA, Zachou K, Bremer B, et al. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;60(1):87-97.
  149. Yurdaydin C. Treatment of chronic delta hepatitis. *Seminars in liver disease*. 2012;32(3):237-44.
  150. Heller T, Rotman Y, Koh C, Clark S, Haynes-Williams V, Chang R, et al. Long-term therapy of chronic delta hepatitis with peginterferon alfa. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2014;40(1):93-104.
  151. Lau DT, Doo E, Park Y, Kleiner DE, Schmid P, Kuhns MC, et al. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1999;30(2):546-9.
  152. Niro GA, Ciancio A, Tillman HL, Lagget M, Olivero A, Perri F, et al. Lamivudine therapy in chronic delta hepatitis: a multicentre randomized-

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- controlled pilot study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2005;22(3):227-32.
153. Erhardt A, Gerlich W, Starke C, Wend U, Donner A, Sagir A, et al. Treatment of chronic hepatitis delta with pegylated interferon-alpha2b. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2006;26(7):805-10.
154. Kabacam G, Onder FO, Yakut M, Seven G, Karatayli SC, Karatayli E, et al. Entecavir treatment of chronic hepatitis D. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(5):645-50.
155. Gunsar F, Akarca US, Ersoz G, Kobak AC, Karasu Z, Yuce G, et al. Two-year interferon therapy with or without ribavirin in chronic delta hepatitis. *Antiviral therapy*. 2005;10(6):721-6.
156. Yurdaydin C, Bozkaya H, Karaaslan H, Onder FO, Erkan OE, Yalcin K, et al. A pilot study of 2 years of interferon treatment in patients with chronic delta hepatitis. *Journal of viral hepatitis*. 2007;14(11):812-6.
157. Rizzetto M, Niro GA. Myrcludex B, a novel therapy for chronic hepatitis D? *Journal of hepatology*. 2016;65(3):465-6.
158. Bogomolov P, Alexandrov A, Voronkova N, Macievich M, Kokina K, Petrachenkova M, et al. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: First results of a phase Ib/IIa study. *Journal of hepatology*. 2016;65(3):490-8.
159. Ciancio A, Rizzetto M. Chronic hepatitis D at a standstill: where do we go from here? *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2014;11(1):68-71.
160. Manesis EK, Vourli G, Dalekos G, Vasiliadis T, Manolaki N, Hounta A, et al. Prevalence and clinical course of hepatitis delta infection in Greece: a 13-year prospective study. *Journal of hepatology*. 2013;59(5):949-56.
161. Borzacov LM, de Figueiredo Nicolete LD, Souza LF, Dos Santos AO, Vieira DS, Salcedo JM. Treatment of hepatitis delta virus genotype 3 infection with peg-interferon and entecavir. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2016;46:82-8.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

162. Cross TJ, Rizzi P, Horner M, Jolly A, Hussain MJ, Smith HM, et al. The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in South London. *Journal of medical virology*. 2008;80(2):277-82.
163. Heidrich B, Manns MP, Wedemeyer H. Treatment options for hepatitis delta virus infection. *Current infectious disease reports*. 2013;15(1):31-8.
164. Deny P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Current topics in microbiology and immunology*. 2006;307:151-71.
165. Farci P. Delta hepatitis: an update. *Journal of hepatology*. 2003;39 Suppl 1:S212-9.
166. Rizzetto M, Ponzetto A, Forzani I. Hepatitis delta virus as a global health problem. *Vaccine*. 1990;8 Suppl:S10-4; discussion S21-3.
167. Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology*. 1997;234(1):160-7.
168. Parana R, Kay A, Molinet F, Viana S, Silva LK, Salcedo JM, et al. HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: A preliminary report. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2006;75(3):475-9.
169. Botelho-Souza LF, Souza Vieira D, de Oliveira Dos Santos A, Cunha Pereira AV, Villalobos-Salcedo JM. Characterization of the Genotypic Profile of Hepatitis Delta Virus: Isolation of HDV Genotype-1 in the Western Amazon Region of Brazil. *Intervirology*. 2015;58(3):166-71.
170. Wu JC, Chiang TY, Sheen IJ. Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *The Journal of general virology*. 1998;79 ( Pt 5):1105-13.
171. Gomes-Gouvea MS, Pereira Soares Mdo C, Guedes de Carvalho Mello IM, Brito EM, Pereira Moia Lde J, Bensabath G, et al. Hepatitis D and B virus genotypes in chronically infected patients from the Eastern Amazon Basin. *Acta tropica*. 2008;106(3):149-55.
172. Alvarado-Mora MV, Fernandez MF, Gomes-Gouvea MS, de Azevedo Neto RS, Carrilho FJ, Pinho JR. Hepatitis B (HBV), hepatitis C (HCV) and hepatitis delta (HDV) viruses in the Colombian population--how is the epidemiological situation? *PloS one*. 2011;6(4):e18888.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

173. Ma SP, Sakugawa H, Makino Y, Tadano M, Kinjo F, Saito A. The complete genomic sequence of hepatitis delta virus genotype IIb prevalent in Okinawa, Japan. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 2):461-4.
174. Viana S, Parana R, Moreira RC, Compri AP, Macedo V. High prevalence of hepatitis B virus and hepatitis D virus in the western Brazilian Amazon. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2005;73(4):808-14.
175. Crispim MA, Fraiji NA, Campello SC, Schriefer NA, Stefani MM, Kiesslich D. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the Western Amazon region, North Brazil. *BMC infectious diseases*. 2014;14:94.
176. Fonseca JC, Simonetti SR, Schatzmayr HG, Castejon MJ, Cesario AL, Simonetti JP. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988;82(3):469-71.
177. Muzio González V, Cinza Estévez Z, Ortega Tápanes A, Véliz Ríos G, Galindo MA, Delgado G, Díaz M, Rodríguez L, Bravo J, Pedroso Flaquet P, et al. *Biotecnología Aplicada*, Vol. 18, No. 2, April 2001, pp. 103-104.
178. Andernach IE, Leiss LV, Tarnagda ZS, Tahita MC, Otegbayo JA, Forbi JC, et al. Characterization of hepatitis delta virus in sub-Saharan Africa. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(5):1629-36.
179. Le Gal F, Gordien E, Affolabi D, Hanslik T, Alloui C, Deny P, et al. Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(5):2363-9.
180. Chudy M, Hanschmann KM, Bozsayi M, Kreß J, Nübling CM. Collaborative Study to Establish a World Health Organization International Standard for Hepatitis D Virus RNA for Nucleic Acid Amplification Technology (NAT) – Based Assays. WHO Report 2013, (WHO/BS/2013).
181. PROGRAMAS NACIONALES DE PESQUISAJE CON TECNOLOGIA SUMA. Citado 28 de Diciembre de 2016, Disponible en: <http://www.tecnosuma.com/ProgramasNacionales.htm#ami>.
182. Romero Martínez K, Pérez Guevara MT, García Agramonte N, Sánchez Diéguez E. Validación del sistema UMELISA HBsAg PLUS utilizando

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- muestras de suero de cordón umbilical. *Rev Cubana Med Trop*, 2013; 65(1) 46-56.
183. Rodríguez L, Montalvo MC, Sariego S, Bello M, Mora E, Kourí V, Martínez PA, Sánchez M, Marrero B. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para la cuantificación del ADN del virus de la hepatitis B. *Rev Cubana Med Trop* 2012;64(3).
184. Rizzetto M. Hepatitis D Virus: Introduction and Epidemiology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2015;5(7):a021576.
185. Kamili S, Drobeniuc J, Mixson-Hayden T, Kodani M. Delta hepatitis: Toward improved diagnostics. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2017;66(6):1716-8.
186. Xiridou M, Borkent-Raven B, Hulshof J, Wallinga J. How hepatitis D virus can hinder the control of hepatitis B virus. *PloS one*. 2009;4(4):e5247.
187. Goyal A, Murray JM. The impact of vaccination and antiviral therapy on hepatitis B and hepatitis D epidemiology. *PloS one*. 2014;9(10):e1110143.
188. Rizzetto M, Ciancio A. Epidemiology of hepatitis D. *Seminars in liver disease*. 2012;32(3):211-9.
189. Gaeta GB, Stroffolini T, Chiaramonte M, Ascione T, Stornaiuolo G, Lobello S, et al. Chronic hepatitis D: a vanishing Disease? An Italian multicenter study. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2000;32(4 Pt 1):824-7.
190. Holmberg SD, Ward JW. Hepatitis delta: seek and ye shall find. *The Journal of infectious diseases*. 2010;202(6):822-4.
191. Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after. *Journal of hepatology*. 2009;50(5):1043-50.
192. Brancaccio G, Giuberti T, Verucchi G, Levantesi M, Sacchini D, Fattovich G, Madonia S, Fasano M, Gavrilu C, Nardi A, et al. 2014. Epidemiological evolution of chronic hepatitis delta in Italy. An analysis of the master-B cohort. *Dig Liv Dis* 46: e12–e13.
193. Servant-Delmas A, Le Gal F, Gallian P, Gordien E, Laperche S. Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;59(2):126-8.
194. Genne D, Rossi I. Hepatitis delta in Switzerland: a silent epidemic. *Swiss medical weekly*. 2011;141:w13176.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

195. Navascues CA, Rodriguez M, Sotorrio NG, Sala P, Linares A, Suarez A, et al. Epidemiology of hepatitis D virus infection: changes in the last 14 years. *The American journal of gastroenterology*. 1995;90(11):1981-4.
196. Viazov SO, Paladi NE, Mkhitarian AL, Gorbarets IP, Iavorkovskaia EK. [The spread of delta infection in the USSR]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii, i immunobiologii*. 1989(10):96-101.
197. Makuwa M, Mintsá-Ndong A, Souquiere S, Nkoghe D, Leroy EM, Kazanji M. Prevalence and molecular diversity of hepatitis B virus and hepatitis delta virus in urban and rural populations in northern Gabon in central Africa. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47(7):2265-8.
198. Foupouapouognigni Y, Noah DN, Sartre MT, Njouom R. High prevalence and predominance of hepatitis delta virus genotype 1 infection in Cameroon. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(3):1162-4.
199. Nwokediuko SC, Ijeoma U. Seroprevalence of antibody to HDV in Nigerians with hepatitis B virus-related liver diseases. *Nigerian journal of clinical practice*. 2009;12(4):439-42.
200. Lunel-Fabiani F, Mansour W, Amar AO, Aye M, Le Gal F, Malick FZ, et al. Impact of hepatitis B and delta virus co-infection on liver disease in Mauritania: a cross sectional study. *The Journal of infection*. 2013;67(5):448-57.
201. Mansour W, Malick FZ, Sidiya A, Ishagh E, Chekaraou MA, Veillon P, et al. Prevalence, risk factors, and molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta virus in pregnant women and in patients in Mauritania. *Journal of medical virology*. 2012;84(8):1186-98.
202. Alavian SM, Alavian SH. Hepatitis D Virus Infection; Iran, Middle East and Central Asia. *Hepatitis Monthly* 2005; 5(4): 137-143.
203. Abbas Z, Jafri W, Raza S. Hepatitis D: Scenario in the Asia-Pacific region. *World journal of gastroenterology*. 2010;16(5):554-62.
204. Takahashi M, Nishizawa T, Gotanda Y, Tsuda F, Komatsu F, Kawabata T, et al. High prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses and viremia of hepatitis B, C, and D viruses among apparently healthy populations in Mongolia. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(2):392-8.
205. Oyunsuren T, Kurbanov F, Tanaka Y, Elkady A, Sanduijav R, Khajidsuren O, et al. High frequency of hepatocellular carcinoma in Mongolia; association

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- with mono-, or co-infection with hepatitis C, B, and delta viruses. *Journal of medical virology*. 2006;78(12):1688-95.
206. Chen X, Oidovsambuu O, Liu P, Grosely R, Elazar M, Winn VD, et al. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2017;66(6):1739-49.
207. Li J, Wang J, Tian K, Wang Y, Zhang L, Huang H. Epidemiology of hepatitis B, C, D and G viruses and cytokine levels among intravenous drug users. *Journal of Huazhong University of Science and Technology Medical sciences = Hua zhong ke ji da xue xue bao Yi xue Ying De wen ban = Huazhong keji daxue xuebao Yixue Yingdewen ban*. 2006;26(2):221-4.
208. Arakawa Y, Moriyama M, Taira M, Hayashi N, Tanaka N, Okubo H, et al. Molecular analysis of hepatitis D virus infection in Miyako Island, a small Japanese island. *Journal of viral hepatitis*. 2000;7(5):375-81.
209. Han M, Littlejohn M, Yuen L, Edwards R, Devi U, Bowden S, et al. Molecular epidemiology of hepatitis delta virus in the Western Pacific region. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2014;61(1):34-9.
210. Duraisamy G, Zuridah H, Ariffin Y, Kek CS. Hepatitis delta virus in intravenous drug users in Kuala Lumpur. *The Medical journal of Malaysia*. 1994;49(3):212-6.
211. Theamboonlers A, Hansurabhanon T, Verachai V, Chongsrisawat V, Poovorawan Y. Hepatitis D virus infection in Thailand: HDV genotyping by RT-PCR, RFLP and direct sequencing. *Infection*. 2002;30(3):140-4.
212. Binh MT, Hoan NX, Van Tong H, Giang DP, Sy BT, Toan NL, et al. HDV infection rates in northern Vietnam. *Scientific reports*. 2018;8(1):8047.
213. Gish RG, Yi DH, Kane S, Clark M, Mangahas M, Baqai S, et al. Coinfection with hepatitis B and D: epidemiology, prevalence and disease in patients in Northern California. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28(9):1521-5.
214. Kushner T, Serper M, Kaplan DE. Delta hepatitis within the Veterans Affairs medical system in the United States: Prevalence, risk factors, and outcomes. *Journal of hepatology*. 2015;63(3):586-92.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

215. Cicero MF, Pena NM, Santana LC, Arnold R, Azevedo RG, Leal ES, et al. Is Hepatitis Delta infections important in Brazil? BMC infectious diseases. 2016;16(1):525.
216. Paraná R, Schinoni MI, and de Souza Campos M. Hepatitis D Virus. En Human Virology in Latin America From Biology to Control. Juan Ernesto Ludert, Flor H. Pujol y Juan Arbiza Editores. Part V Sexually and Blood Borne Transmitted Diseases, pag. 361. Springer International Publishing AG 2017. Suiza. ISBN 978-3-319-54566-0 ISBN 978-3-319-54567-7 (eBook) DOI 10.1007/978-3-319-54567-7.
217. Alvarado-Mora MV, Pinho JR. Epidemiological update of hepatitis B, C and delta in Latin America. Antiviral therapy. 2013;18(3 Pt B):429-33.
218. di Filippo Villa D, Cortes-Mancera F, Payares E, Montes N, de la Hoz F, Arbelaez MP, et al. Hepatitis D virus and hepatitis B virus infection in Amerindian communities of the Amazonas state, Colombia. Virology journal. 2015;12:172.
219. Hadler SC, De Monzon M, Ponzetto A, Anzola E, Rivero D, Mondolfi A, et al. Delta virus infection and severe hepatitis. An epidemic in the Yucpa Indians of Venezuela. Annals of internal medicine. 1984;100(3):339-44.
220. Manock SR, Kelley PM, Hyams KC, Douce R, Smalligan RD, Watts DM, et al. An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the Amazon basin of Ecuador. The American journal of tropical medicine and hygiene. 2000;63(3-4):209-13.
221. Delfino CM, Eirin ME, Berini C, Malan R, Gentile E, Castillo A, et al. HDAg-L variants in covert hepatitis D and HBV occult infection among Amerindians of Argentina: new insights. Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology. 2012;54(3):223-8.
222. Alvarado-Esquivel C, Sablon E, Martinez-Garcia S, Estrada-Martinez S. Hepatitis virus and HIV infections in inmates of a state correctional facility in Mexico. Epidemiology and infection. 2005;133(4):679-85.
223. Barton EN, King SD, Douglas LL. The seroprevalence of hepatitis and retroviral infection in Jamaican haemodialysis patients. The West Indian medical journal. 1998;47(3):105-7.
224. Leon P, Venegas E, Bengoechea L, Rojas E, Lopez JA, Elola C, et al. [Prevalence of infections by hepatitis B, C, D and E viruses in Bolivia].

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health. 1999;5(3):144-51.
225. Romeo R, Perbellini R. Hepatitis delta virus: Making the point from virus isolation up to 2014. *World journal of hepatology*. 2015;7(22):2389-95.
226. Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2014;4(11):a021550.
227. Colloredo G, Bellati G, Leandro G, Colombatto P, Rho A, Bissoli F, Brunette MR, Angeli G, Ideo G and Bonino F. Quantitative analysis of IgM anti-HBc in chronic hepatitis B patients using a new "gray-zone" for the evaluation of "borderline" values. *Journal of Hepatology* 1996; 25: 644648.
228. Lutgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, et al. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012;55(3):685-94.
229. Zachou K, Yurdaydin C, Drebber U, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, et al. Quantitative HBsAg and HDV-RNA levels in chronic delta hepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2010;30(3):430-7.
230. Romeo R, Foglieni B, Casazza G, Spreafico M, Colombo M, Prati D. High serum levels of HDV RNA are predictors of cirrhosis and liver cancer in patients with chronic hepatitis delta. *PloS one*. 2014;9(3):e92062.
231. Coller KE, Butler EK, Luk KC, Rodgers MA, Cassidy M, Gersch J, et al. Development and performance of prototype serologic and molecular tests for hepatitis delta infection. *Scientific reports*. 2018;8(1):2095.
232. Olivero A, Smedile A. Hepatitis delta virus diagnosis. *Seminars in liver disease*. 2012;32(3):220-7.
233. Cunha C, Tavanez JP, Gudima S. Hepatitis delta virus: A fascinating and neglected pathogen. *World journal of virology*. 2015;4(4):313-22.
234. Ghamari S, Alavian SM, Rizzetto M, Olivero A, Smedile A, Khedive A, et al. Prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in chronic hepatitis B patients with unusual clinical pictures. *Hepatitis monthly*. 2013;13(8):e6731.
235. Sy BT, Ratsch BA, Toan NL, Song le H, Wollboldt C, Bryniok A, et al. High prevalence and significance of hepatitis D virus infection among treatment-

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- naive HBsAg-positive patients in Northern Vietnam. *PloS one*. 2013;8(10):e78094.
236. D' Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis: A systematic review of 118 studies. *Journal of Hepatology*. 2006; 44:217-31.
237. D' Amico G. Stages Classification of Cirrhosis: Where Do We Stand? In: De Franchis R. editor. *Portal Hypertension V. Proceedings of the Fifth Baveno International Concensus Workshop*. Fifth edition 2011: 132-136.
238. Sureau C, Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *Journal of hepatology*. 2016;64(1 Suppl):S102-s16.
239. Niro GA, Smedile A, Andriulli A, Rizzetto M, Gerin JL, Casey JL. The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 1997;25(3):728-34.
240. Alvarado-Mora MV, Locarnini S, Rizzetto M, Pinho JR. An update on HDV: virology, pathogenesis and treatment. *Antiviral therapy*. 2013;18(3 Pt B):541-8.
241. Taylor JM, Farci P, Purcell RH. Hepatitis D (Delta) Virus. Chapter 77. En Knipe, David M.; Howley, Peter M Editors. *Fields Virology*, 5th Edition. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2007, pags: 3032-3046.
242. Liao B, Zhang F, Lin S, He H, Liu Y, Zhang J, et al. Epidemiological, clinical and histological characteristics of HBV/HDV co-infection: a retrospective cross-sectional study in Guangdong, China. *PloS one*. 2014;9(12):e115888.
243. L Caballería, P Torán, J Caballería - *Medicina Clínica* 2017, 150 (8):310-16.
244. Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *Journal of hepatology*. 2016;64(1 Suppl):S117-s31.
245. Farci, P, y Niro, GA. Current and Future Management of Chronic Hepatitis D. *Gastroenterology & Hepatology* 2018, 6(14):342-351.
246. Abbas Z, Memon MS, Mithani H, Jafri W, Hamid S. Treatment of chronic hepatitis D patients with pegylated interferon: a real-world experience. *Antiviral therapy*. 2014;19(5):463-8.
247. Abbas Z, Abbas M. Management of hepatitis delta: Need for novel therapeutic options. *World journal of gastroenterology*. 2015;21(32):9461-5.

## **VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

248. Yurdaydin C. Recent advances in managing hepatitis D. F1000Research. 2017;6:1596.
249. Lempp FA, Urban S. Hepatitis Delta Virus: Replication Strategy and Upcoming Therapeutic Options for a Neglected Human Pathogen. Viruses. 2017;9(7).

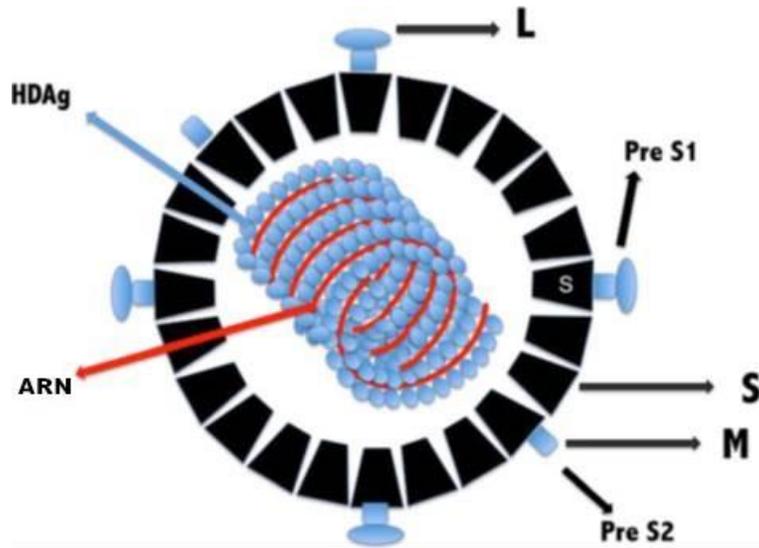
## IX. ANEXOS

### ANEXO 1. Las hipótesis que justifican el origen del VHD\*.

- Una infección aguda por el VHB que se vuelve crónica, extendiéndose a prácticamente todos los hepatocitos en el hígado.
- La replicación del VHB también implica la transcripción de muchas secuencias virales, algunas de las cuales se empalmaron las que potencialmente tuvieron la posibilidad de formar ARN circulares estables.
- Un ARN circular raro fue seleccionado, debido a que este tenía la capacidad de multiplicarse, utilizando las polimerasa del hospedero o porque tenía la capacidad de expresar una proteína corta intrínsecamente desordenada (favoreciendo la multimerización) y cargada positivamente (favoreciendo la unión al ARN).
- Un incremento en la eficiencia de replicación y acumulación de la proteína de unión codificada, hace que esta se convierta en el antígeno delta pequeño. La secuencia de ARN que se replica experimenta muchos cambios de nucleótidos, distinguiéndolos de las secuencias del VHB. Dichos cambios podrían introducirse por la incorporación errónea de nucleótidos durante la transcripción y los eventos de edición del ARN postranscripcional.
- Una modificación post-transcripcional en un sitio específico del ARN mediante una enzima que edita el ARN, provoca la traducción de una segunda forma alargada C-terminal de la proteína, el antígeno delta grande que experimentara farnesilación. Esta farnesilación facilita la unión de los complejos de ribonucleoproteína del VHD a las proteínas de la envoltura del VHB, lo que conduce a la liberación de partículas de virus que pueden infectar a hepatocitos susceptibles y volver a replicarse en el interior de los mismos. Esto, en presencia de coinfección por el VHB, conduce a la liberación de más VHD.

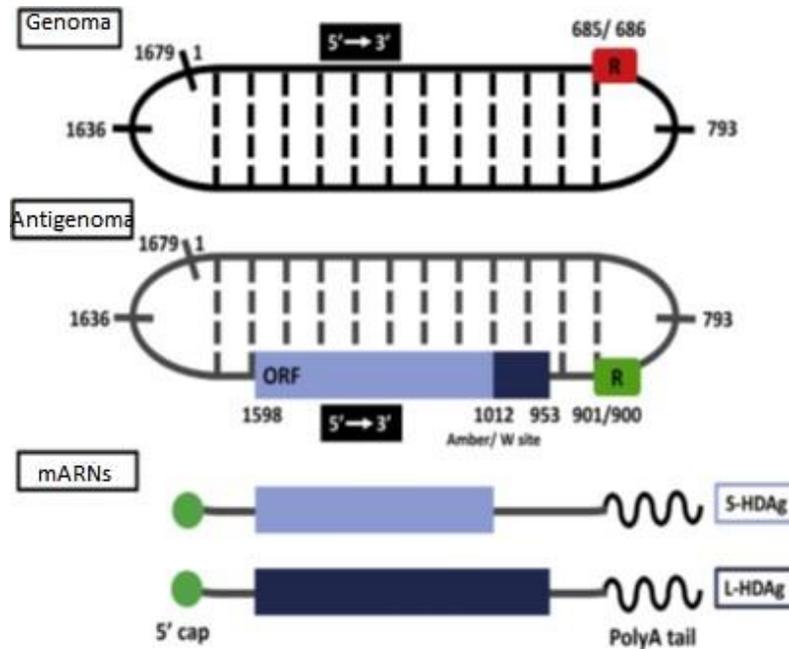
\*Adaptado de Taylor, J. M. (2014), Host RNA circles and the origin of hepatitis delta virus, World journal of gastroenterology, 20(11), 2971-2978, doi: 10.3748/wjg.v20.i11.2971.

**ANEXO 2. La estructura del VHD\*.**



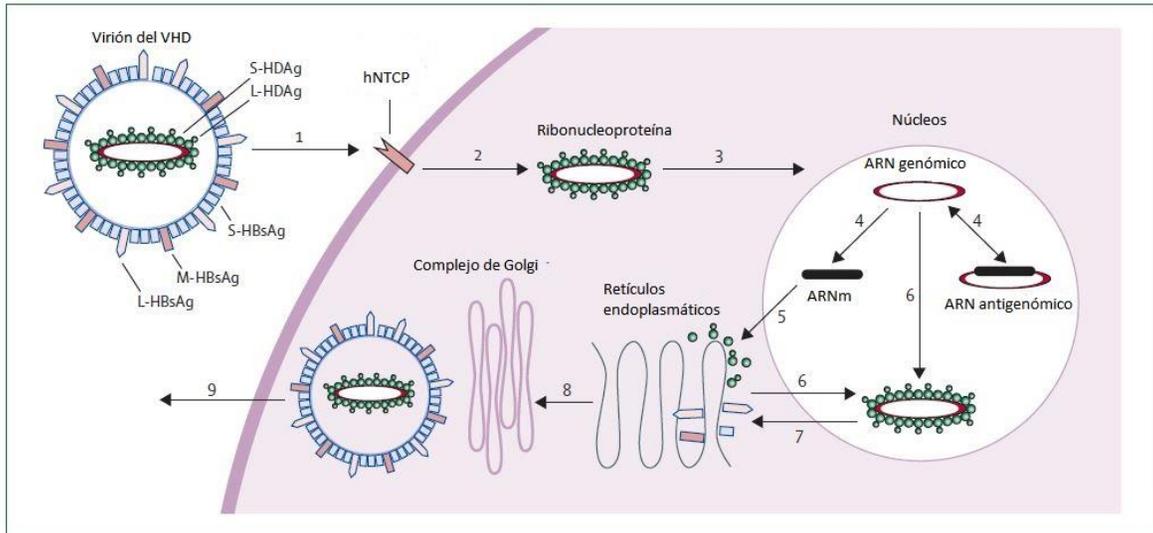
\*Adaptado de Botelho-Souza, L. F., M. P. A. Vasconcelos, A. O. Dos Santos, J. M. V. Salcedo, and D. S. Vieira (2017), Hepatitis delta: virological and clinical aspects, *Virology journal*, 14(1), 177, doi: 10.1186/s12985-017-0845-y.

## ANEXO 3. El ARN del VHD\*



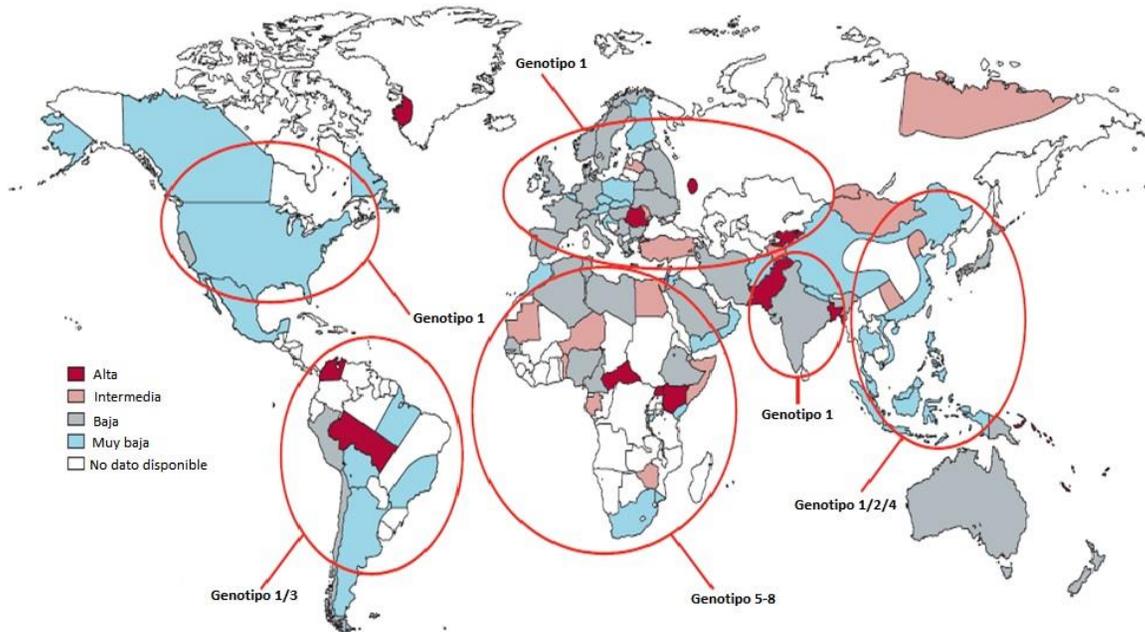
\*Adaptado de Alfaiate, D., P. Deny, and D. Durantel (2015), Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options, *Antiviral research*, 122, 112-129, doi: 10.1016/j.antiviral.2015.08.009.

ANEXO 4. El ciclo de replicación viral\*



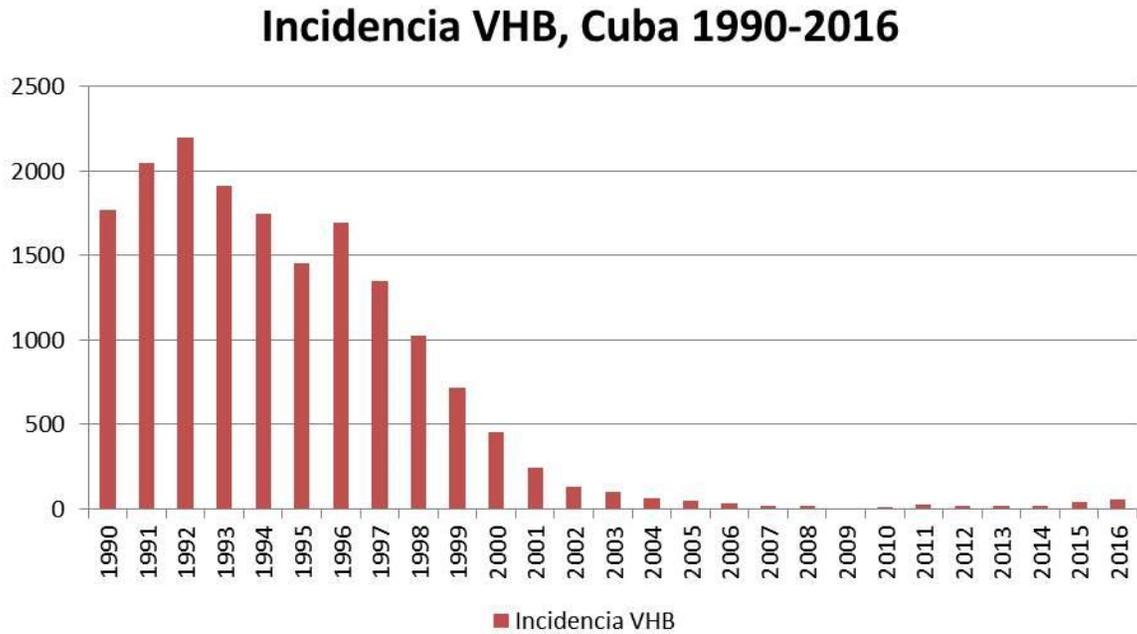
\*Adaptado de Hughes, S. A., H. Wedemeyer, and P. M. Harrison (2011), Hepatitis delta virus, Lancet (London, England), 378(9785), 73-85, doi: 10.1016/s0140-6736(10)61931-9.

**ANEXO 5. Epidemiología molecular del VHD\*.**



\*Adaptado de Hughes, S. A., H. Wedemeyer, and P. M. Harrison (2011), Hepatitis delta virus, *Lancet* (London, England), 378(9785), 73-85, doi: 10.1016/s0140-6736(10)61931-9.

**ANEXO 6. Incidencia del VHB de Cuba,1990-2016**



Fuente: Dirección Nacional de Epidemiología, cortesía Dra. Maria Julia Matos, Jefa del Programa Nacional de Control de las hepatitis virales, MINSAP

ANEXO 7. Consideraciones Éticas

	<p><b>INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"</b> Ministerio de Salud Pública</p> <p><b>Centro Auspiciado por la UNESCO Centro Colaborador de la OMS/OPS</b></p> <p>Para el adiestramiento e investigaciones en Malacología Médica y control biológico de Vectores y huéspedes intermediarios Para el estudio de las Enfermedades Viricas En Tuberculosis y Micobacterias</p>	 <p><b>INSTITUTO Pedro Kourí</b></p>
<p><b>COMITÉ DE ETICA INSTITUCIONAL PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN CEI-IPK 05-16</b></p>		
<p><b>"Hepatitis Delta en Cuba"</b></p>		
<p><b>INVESTIGADOR PRINCIPAL</b></p>		
<p><b>Dra. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, DrC.</b></p>		
<p>Después de realizada la valoración y análisis correspondiente al presente documento por los integrantes del Comité de Ética de la institución, siguiendo las guías internacionales de trabajo de estas comisiones de la Organización Mundial de la Salud, emitimos el siguiente:</p>		
<p><b>DICTAMEN</b></p>		
<ol style="list-style-type: none"><li>1. El documento presentado se ajusta a los principios establecidos por la Declaración de Helsinki así como a las normas y criterios éticos establecidos en los códigos nacionales de ética y regulaciones legales vigentes en Cuba.</li><li>2. En el protocolo aparecen reflejados de forma clara los aspectos éticos que se ajustan al tipo de investigación propuesta.</li><li>3. Se aprueba el protocolo presentado</li></ol>		
<p>Dado, en el IPK, La Habana, a los 26 días del mes de febrero de 2016</p>		
<p>DrCs. Eric Martínez Torres Presidente</p> <p>DrCs. Pedro Mas Bermejo Vicepresidente</p> <p>DrC. Iliana Valdés Hernández Secretaria</p>		<p>Dra. Nereyda Cabrera Cantelar Miembro</p> <p>Dr. Roberto Fernández Llanes Miembro</p>

**ANEXO 8. Consentimiento informado**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

El que suscribe: \_\_\_\_\_

Conozco que:

La infección por el virus de la hepatitis delta (VHD) es una de las complicaciones más severas de hepatitis virales con rápida progresión a cirrosis, riesgo incrementado de descompensación hepática y muerte cuando se compara con la mono infección con el virus de la hepatitis B (VHB).

El VHD es un virus defectivo, ya que requiere de la presencia del antígeno de superficie del VHB (HBsAg) para ensamblar las partículas virales infecciosas. Dos patrones de infección por el VHD se han descrito: co-infección con el VHB y superinfección.

Para el diagnóstico de una infección por el VHD, se debe tomar una muestra de suero para la detección de anticuerpos totales, IgM e IgG. Una vez que se ha confirmado la presencia de anticuerpos anti-VHD, se impone realizar detección del genoma viral a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) y determinar el genotipo viral, útiles para la instauración y el seguimiento de la terapéutica. Se debe realizar un seguimiento bioquímico y virológico para confirmar la efectividad del tratamiento.

He conocido mi diagnóstico de co-infección VHB y VHD. Hago constar por este medio mi consentimiento informado para que se me realice un seguimiento clínico, bioquímico y virológico de mi patología y se me tomen muestras de sangre para realizar RCP y genotipaje.

Declaro que he sido informado del objetivo del estudio y que se me ha explicado también todas las ventajas que para el seguimiento de mi enfermedad posee la información que se deriva de este estudio.

Para constancia de lo expuesto anteriormente firmo este documento en \_\_\_\_\_ el día \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del 201\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Firma (paciente).

\_\_\_\_\_  
Firma (recoge la información)