

**INFECCIÓN OCULTA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B EN GRUPOS DE RIESGO CUBANOS: IMPLICACIONES PARA LA ELIMINACIÓN.**

**UNIDAD EJECUTORA PRINCIPAL:** Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”

**AUTORES PRINCIPALES:** Lic. Marité Bello Corredor, MSc y Dra. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, PhD.

**OTROS AUTORES:** Dra. María Caridad Montalvo Villalba, Lic. Susel Sariego Frómata, Dra. Lidunka Valdés Alonso, Dr. Manuel Díaz González, Dr. Denis Verdasquera Corcho, Dr. Plácido Pedroso Flaquet, Dr. Alberto Baly Gil, Lic. Yoandra Abad Lamothe, Téc. Bárbara Marrero Sánchez, Téc. Meilin Sánchez Wong, Téc. Aidonis Gutiérrez Moreno, Lic. Annia Gertrudis Chibás Ojeda, Lic. Marguerite Vincent, Lic. Emilio Valdivia Malquí, Lic. Delmira Rodríguez Argueta.

**COLABORADORES:** Téc. Aurélie Sausy, Dra. Judith M. Hübschen, Dr. Claude P. Muller

**ENTIDADES PARTICIPANTES:** Infectious Diseases Research Unit, Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Grand-Duchy of Luxembourg.

**AUTORES PARA LA CORRESPONDENCIA:**

Lic. Marité Bello Corredor, MSc y Dra. Licel de los Ángeles Rodríguez Lay, MD, PhD.

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), Autopista Novia del Mediodía, Km 61/2, La Lisa, P O Box 601, Marianao 13, La Habana, Cuba. Fax (537) 2046051, Teléfono (537) 2553546, E-mail: [marite@ipk.sld.cu](mailto:marite@ipk.sld.cu), [licel@ipk.sld.cu](mailto:licel@ipk.sld.cu).

**RESUMEN.**

**Antecedentes:** La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) constituye un problema de gran impacto en Salud Pública a nivel mundial. El mejoramiento de la sensibilidad de los métodos de detección de ácidos nucleicos, permitió la descripción de una nueva fase de la hepatitis B crónica: la infección oculta por el VHB (IOB), caracterizada por la no detección del HBsAg, presencia de anti-HBc, baja carga viral en suero y presencia de anti-HBs. Cuba es un país de baja prevalencia del VHB que posee una Estrategia Nacional

para la eliminación de la misma. Después de 25 años la tasa de nuevas infecciones se ha reducido 100 veces. **Problema a resolver y objetivos del trabajo:** No se conoce la presencia y magnitud de la IOB en la población cubana, aspecto crucial para las metas de eliminación de la enfermedad ya que podrían contribuir a la existencia de reservorios no conocidos del virus y potencialmente infectar a la población susceptible. El presente estudio aporta evidencias científicas que permiten guiar al Programa Nacional de Control y el manejo clínico-terapéutico, además, se implementa una metodología para el diagnóstico de esta entidad. Los objetivos fueron identificar la presencia de IOB en pacientes de riesgo de infección por el VHB: seropositivos al VIH, pacientes en hemodiálisis e hijos de madres positivas al HBsAg y determinar si existe relación entre la presencia de infección oculta con algunas variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas. **Materiales y Métodos:** Se colectaron 1276 muestras de suero de pacientes negativos al HBsAg (325 de individuos seropositivos al VIH, 660 de pacientes en tratamiento de hemodiálisis y 291 a hijos de madres positivas al HBsAg). Se realizó detección de marcadores de exposición (anti-HBc) y marcadores de inmunidad (anti-HBs) según un algoritmo diagnóstico basado en el perfil serológico de la IOB. A las muestras seleccionadas se les realizó detección y cuantificación del ADN-VHB (PCR Tiempo Real). En 32 muestras de hijos de madres HBsAg+ de entre 3 y 18 años de edad, se analizaron todos los marcadores, en caso de ADN-VHB positivo se realizó secuencia nucleotídica del gen S, detección de mutaciones y análisis filogenético. Para el análisis de la información se utilizaron los programas SPSS, EpiInfo y STATA™. Se realizó análisis de regresión logística univariado, considerando significativo los valores de OR para los cuales  $p < 0,05$  y el intervalo de confianza del 95% no incluía el 1. **Resultados:** La prevalencia de exposición fue de 318/1276 (24.9%). La inmunidad al VHB (anti-HBs) en las muestras con previa exposición al virus permitió escoger 134 muestras para detectar IOB. La IOB fue identificada en el 28.9% de las muestras. Con respecto al total de muestras la IOB fue de 2.9%. Las cargas virales oscilaron en un rango de  $2,15E+01$ - $2,43E+05$  UI/mL. No se encontró asociación estadística significativa entre la IOB y las variables de estudio. Se encontró IOB en una niña de 3 años con un patrón serológico inusual (anti-HBc negativo y elevados títulos de anti-HBs (11,605 UI/L), 7 años después se mantuvo el patrón anti-HBc negativo y títulos de anti-HBs (308 IU/L) con carga viral no detectable. La secuencia parcial del gen S del virus recuperado del caso de IOB mostró ausencia de mutaciones de escape a la vacuna. Se concluye que aunque el diagnóstico de IOB es bajo, estos pacientes podrían constituir reservorios del VHB, reafirmando la importancia de la detección y seguimiento de estos marcadores en estos grupos de riesgo. La positividad al ADN del VHB temprano en la vida, no necesariamente resulta en su persistencia prolongada, y que el estatus de anti-HBs, podría ser un importante indicador en el aclaramiento viral. No se encontraron mutaciones asociadas con escape a la vacuna, por lo que otros factores podrían estar involucrados en la presencia de IOB en niños vacunados.

## **COMUNICACIÓN CORTA**

La infección por el virus de la hepatitis B (VHB) es un serio problema de salud a nivel global. Estimados mundiales señalan que este agente ha infectado a más de 2000 millones de personas y que existen más de 350 millones de portadores en el mundo, de los cuales se espera que el 25% de ellos muera de enfermedad crónica del hígado, cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular primario. Cada año un millón de personas fallecen por secuelas agudas o crónicas provocadas por el VHB y se producen más de cuatro millones de casos clínicos agudos, considerándose como una de las mayores causas de morbimortalidad por enfermedades infecciosas a nivel mundial.

Esta ampliamente aceptado que existen 4 fases de infección crónica por el VHB: tolerancia inmune, aclaramiento inmune, portador inactivo y la hepatitis B crónica HBeAg-negativa. Dichas fases poseen características serológicas, moleculares e histológicas que las distinguen y ayudan en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes infectados. Desde finales de los años 70 se describió un tipo de infección adicional correspondiente a individuos negativos para el marcador serológico principal de infección: el HBsAg y presencia del genoma viral. Al principio controversial, la evidencia de la infección por VHB post-transfusional proveniente de un donante con marcadores negativos y el desarrollo de hepatitis viral aguda en chimpancés inoculados con sueros de individuos negativos para los marcadores serológicos, pero con detección del genoma del VHB, permitió la aceptación por la comunidad científica como una nueva fase de la hepatitis B crónica.

Es de destacar que fue el mejoramiento de la sensibilidad de los métodos de detección de ácidos nucleicos, el que permitió la descripción de esta nueva fase de la hepatitis B crónica, a la que se denominó infección oculta por el VHB (IOB). Los criterios para definir la IOB son: i) no detección del HBsAg, ii) presencia de anti-HBc, iii) baja carga viral VHB en suero, iv) presencia de ADN viral e intermediarios replicativos en tejido hepático, v) presencia en algunos casos de anti-HBs. La IOB es una entidad multifactorial, se plantea que la presencia de mutaciones y/o variantes en el determinante "a" que impidan la detección del HBsAg, mecanismos epigenéticos (como la metilación de la isla CpG II del VHB), factores que influyen en la producción del ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) y su persistencia en el núcleo del hepatocito, mayores niveles de interleuquina-10 (IL-10) e IL-17a, interferencia viral, reservorios del virus en sitios extra hepáticos y formación de inmunocomplejos, entre otros, intervienen en la presencia de IOB.

Cuba es un país de baja prevalencia del VHB. A partir del desarrollo de la Biotecnología, se logró obtener en 1989 una vacuna recombinante contra la Hepatitis B, llamada Heberbiovac-HB, 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 de más del 99% en los últimos 16 años y se produjo una drástica reducción de la incidencia de la hepatitis B en la población general, de más del 99%. Después de 25 años de vacunación a los grupos antes mencionados, la tasa de nuevas infecciones se ha reducido 100 veces (0.3/100 000 habitantes).

Otros beneficios del desarrollo científico del país, fue la creación de una amplia y desarrollada red de diagnóstico y certificación de la sangre en todo el país a través del sistema Ultramicroanalítico, SUMA. Adicionalmente, el Banco de Sangre Provincial de la Habana y la Empresa de Sueros y Productos Hemoderivados (ESPH), se incorporaron a la pesquisa de la sangre donada, así como la sangre usada como materia prima para la producción de hemoderivados respectivamente, utilizando técnicas moleculares comerciales.

Los resultados exitosos del Programa de Prevención y Control de la hepatitis B han llevado al pensamiento de lograr la eliminación de esta entidad. Este anhelo se concreta en resultados bien establecidos, sin embargo, no se conoce la presencia y magnitud de infecciones ocultas en la población cubana, aspecto crucial para las metas de eliminación de la enfermedad ya que podrían contribuir a la existencia de reservorios no conocidos del virus y ser potenciales fuentes de infección a la población susceptible.

Los objetivos de este estudio fueron identificar la presencia de infección oculta en pacientes de riesgo de infección por el VHB: seropositivos al VIH, pacientes en hemodiálisis e hijos de madres positivas al HBsAg y determinar si existe relación entre la presencia de infección oculta con algunas variables sociodemográficas, clínicas y epidemiológicas.

Se colectaron 1276 muestras de suero de pacientes negativos al HBsAg, de las cuales 325 correspondían a individuos seropositivos al VIH, 660 a pacientes en tratamiento de hemodiálisis y 291 a hijos de madres HBsAg+ de 7 meses a 5 años de edad. Dichas muestras provenían de todo el país durante el período 2002-2012. Se realizó detección de marcadores de exposición (anti-HBc) y marcadores de inmunidad (anti-HBs) según un algoritmo diagnóstico basado en el perfil serológico de la IOB. Las muestras que resultaron anti-HBc positivas y anti-HBs <50 UI/L se les realizó detección y cuantificación del ADN-VHB a través de una PCR en Tiempo Real. En 32 muestras de hijos de madres positivas al HBsAg de entre 3 y 18 años de edad, se analizaron todos los marcadores, obviando el algoritmo anterior. En caso de positividad al ADN del VHB, se realizó secuencia nucleotídica del gen S, detección de mutaciones y análisis filogenético. Para el análisis de la información se confeccionaron bases de datos y se utilizaron diferentes programas: SPSS, EpiInfo y STATA™. Se realizó análisis de regresión logística univariado, considerando significativo los valores de OR para los cuales  $p < 0,05$  y el intervalo de confianza del 95% no incluía el 1.

La prevalencia de exposición (presencia de anti-HBc total) al VHB en las muestras estudiadas fue de 318/1276 (24.9%), lo cual nos permitió concluir que los pacientes seropositivos al VIH, hemodializados e hijos de madres positivas al HBsAg, tienen un elevado riesgo de exposición al VHB y por tanto nuestra muestra de estudio fue adecuada para el objetivo propuesto. La inmunidad al VHB (anti-HBs) en las muestras con previa exposición al virus permitió escoger 134 muestras según su patrón serológico para buscar IOB (31, 23.1%) con títulos <10 UI/L y 103 (76.8%) con títulos entre 10 y 49.9 UI/L. Valor añadido del presente estudio es que se identificaron individuos/pacientes que carecen o poseen títulos protectores bajos de anti-HBs a pesar de estar contemplados en la Estrategia de eliminación de la hepatitis B.

La IOB fue identificada en 37/128 (28.9%) muestras (el volumen de 6 muestras provenientes de hijos de madres positivas al HBsAg fue insuficiente para realizar la técnica). Se correspondieron a su vez en 24, 58.1 y 14% según grupo de riesgo: individuos seropositivos al VIH, pacientes en tratamiento de hemodiálisis e hijos de madres positivas al HBsAg respectivamente. Con respecto al total de muestras la IOB fue de 37/1270 (2.9%). Las cargas virales oscilaron en un rango de  $2,15E+01$  a  $2,43E+05$  UI/mL. Si bien el diagnóstico de IOB es bajo en los pacientes estudiados, predominando en aquellos con títulos no protectores, estos pacientes podrían constituir reservorios del VHB, lo que reafirma la importancia de la detección y seguimiento de estos marcadores en estos grupos de riesgo. Además, la identificación de estos pacientes con IOB permite un seguimiento por las consultas especializadas para evitar las complicaciones bien conocidas de la infección crónica y tomar acciones epidemiológicas de control.

No se encontró asociación estadística significativa entre la IOB y las variables de estudio cuando se relacionó la positividad al ADN-VHB de acuerdo a algunas variables clínicas, epidemiológicas y virológicas en los grupos estudiados. Esta relación ha sido frecuentemente descrita en la literatura, no obstante, dicha asociación no está fuertemente demostrada y en ocasiones los resultados son confusos, otros estudios han de diseñarse para lograr comprender dicha relación.

En 30 niños hijos de madres positivas al HBsAg de entre 3 y 18 años de edad y negativos al HBsAg, se encontró IOB en una niña de 3 años (3.3%) con un patrón serológico inusual (anti-HBc negativo y elevados títulos de anti-HBs (11,605 UI/L), 7 años después se mantuvo el patrón anti-HBc negativo y títulos de anti-HBs más bajos (308 IU/L) con carga viral no detectable. Dicho resultado podría sugerir que la positividad al ADN del VHB temprano en la vida, no necesariamente resulta en su persistencia prolongada, y que el estatus de anti-HBs, podría ser un importante indicador en el aclaramiento viral (factor protector?). La secuencia parcial del gen S del virus recuperado del caso de IOB mostró ausencia de mutaciones de escape a la vacuna, por lo que otros factores podrían estar involucrados en la presencia de IOB en estos niños vacunados.

Para concluir esta comunicación cito una frase de nuestro Héroe Nacional José Martí que encierra todo el impacto del presente estudio...*para precaverse de los riesgos hay que saber dónde están...* El presente estudio ha descrito la presencia de infecciones ocultas por el VHB, para ofrecer al personal de salud, a las autoridades competentes, a la comunidad científica y en general a la sociedad, de un nuevo conocimiento que redundara en un cambio de pensamiento, de algoritmos diagnóstico, de manejo clínico y terapéutico, de las estrategias de vacunación y en general del conocimiento de una entidad que puede ser eliminada en corto plazo.

## **IMPACTOS DEL RESULTADO**

### **Científicos y sociales:**

1. Constituye el primer estudio acerca de la presencia, magnitud y algunos factores asociados a la IOB en grupos de riesgo de infección por el VHB en Cuba.
2. Los resultados obtenidos permitieron alertar al Sistema Nacional de Salud acerca de la presencia de IOB en los grupos estudiados y de la existencia de reservorios no conocidos del VHB y por tanto, que pueden ser fuentes potenciales de infección en personas no protegidas.
3. Se incorporaron nuevas metodologías, algoritmos de diagnóstico y el desarrollo de capacidades humanas para el enfrentamiento a una entidad nueva y poco conocida.
4. Aporte a la comunidad científica de la secuencia nucleotídica parcial del gen S de una muestra con IOB, de interés nacional e internacional.
5. Se describe por primera vez el seguimiento en el tiempo de la IOB en hijos de madres positivas al HBsAg y la posible influencia de los anticuerpos protectores en el aclaramiento de la misma.
6. La presencia de IOB, justifica la implementación de la vigilancia molecular de cepas circulantes (mutantes de escape vacuna), guía las estrategias de vacunación (en grupos de riesgo) y el manejo clínico-terapéutico.
7. Aporta datos de interés del modelo cubano con vistas a la eliminación de la hepatitis B.

Los resultados obtenidos están en correspondencia con el Lineamiento 159 para el desarrollo económico y social del país en el que se plantea y cito: "Fortalecer las acciones en la promoción y prevención para el mejoramiento del estilo de vida, que contribuyan a incrementar los niveles de salud de la población con la participación intersectorial y comunitaria". De igual manera el lineamiento 160 que plantea y cito: Garantizar que la formación de especialistas médicos brinde respuesta a las necesidades del país, en este sentido nuestros resultados fueron posibles por la formación de varios especialistas en esta disciplina en centros de excelencia mundiales, así como, por un entrenamiento que se llevó a cabo en el Instituto de Salud de Luxemburgo.

#### **PUBLICACIONES QUE AVALAN EL RESULTADO:**

- Bello M, Montalvo MC, Rodríguez L, Sariego S, Verdasquera D, Vincent M, Gutiérrez A, Sánchez M. Occult Hepatitis B in Cuban HIV Patients. **MEDICC Review**, 2011, Vol 13, No 2:32-37 (**Factor de Impacto: 1.807**).
- Sariego Frómeta S, Valdivia Malqui E, Bello Corredor M, Montalvo Villalba MC, Bali A, Sánchez Wong M, Marrero Sánchez B, Rodríguez Lay LA. Infección oculta por el virus de la Hepatitis B en pacientes hemodializados Cubanos. **Rev Cubana Med Trop** 2016, 68(3). (**Factor de Impacto: 0.13**).
- Bello-Corredor M, Rodríguez-Lay LA, Rodríguez-Argueta D, Montalvo-Villalba MC, Pedroso Flaquet P, Sariego-Frómeta S, Sánchez-Wong M. Infección oculta por el virus de la hepatitis B en hijos de madres positivas al HBsAg. **VacciMonitor** 2016;25(1):12-18 (**Factor de Impacto: 0.3**).

- Rodríguez Lay LA, Bello Corredor M, Montalvo Villalba MC, Chibás Ojeda AG, Sariago Frómeta S, Diaz González M, Abad Lamoth Y, Sánchez Wong M, Sausy A, Muller CP, Hübschen JM. Hepatitis B virus infection assessed 3 to 18 years after vaccination in Cuban children and adolescents born to HBsAg-positive mothers. **Archives of Virology**, 2017, 162(8), 2393-2396, DOI 10.1007/s00705-017-3365-6 (**Factor de Impacto: 2.058**).