

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**Epidemiología y diagnóstico del virus de la Hepatitis B en  
familiares de individuos HbsAg positivo: distribución  
intrafamiliar de subtipos virales**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Alberto Delgado-Iribarren García-Campero**

**Director**

**Luis Guerra Romero**

**Madrid**

**EPIDEMIOLOGIA Y DIAGNOSTICO  
DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B  
EN FAMILIARES DE INDIVIDUOS  
HBSAG POSITIVO:  
DISTRIBUCION INTRAFAMILIAR  
DE SUBTIPOS VIRALES**

PONENTE: SR. DR. RAFAEL ROTGER ANGLADA  
 PRESIDENTE SR. DR. CESAR NOMBRO CAND  
 VOCALES SR. DR. FERNANDO BAGOERO  
 VOCALES SR. DR. JUAN J. PILARO  
 VOCALES SR. DR. RAUL ORTIZ DE LEJARZU  
 SECRETARIO: SR. DR. ANGELA GOMEZ ALFARIZ

**Tesis Doctoral presentada por  
Alberto Delgado-Iribarren  
García-Campero**

## **Dedicatoria de la tesis doctoral**

*A Teresa, Begoña, Juan, Bruno e Isa, miembros de mi unidad familiar, a los que tantas horas de mi vida he dejado de dedicar por este y otros motivos.*

## **Agradecimientos**

*A la Dra. Sheila Grace y a Murex Diagnóstico por la amable cesión de los anticuerpos monoclonales utilizados.*

*A los miembros del Servicio de Microbiología del Area Sanitaria Fuenlabrada-Leganés que han llevado a cabo el proyecto de vacunación y diagnóstico del VHB posibilitando la realización de este trabajo.*

## Indice

### Página

- Prólogo	5
- Objetivos	6
- Introducción	7
1. Recuerdo histórico del VHB	7
2. El virus	8
3. Infección	17
4. Patogénesis	21
5. Diagnóstico	23
6. Epidemiología	29
7. Difusión intrafamiliar	38
- Material y métodos	45
1. Pacientes	45
2. Ensayos serológicos	47
3. Subtipado del VHB	48
4. PCR	49
5. Vacunación	50
6. Estudio estadístico	50
- Resultados	52
A. Epidemiología de la transmisión intrafamiliar	53
1. Casos índice	53
2. Marcadores de los familiares	53
3. Subtipos virales	67
4. Comparación de los casos de hepatitis agudas con los de hepatitis crónicas	71
5. Comparación de los familiares con CI HbeAc+ respecto a los CI HbeAg+	72
6. Agregación familiar	73
7. Infección por el VHD	77
B. Estudio serológico de familiares con marcadores atípicos	78
1. Familiares con HbcAc aislado	78
2. Vacunación natural	92
C. Programa de vacunación	93

- <b>Discusión</b>	94
A. Epidemiología de la transmisión intrafamiliar	95
1. Casos índice	95
2. Difusión intrafamiliar	95
3. Subtipos virales	101
4. Comparación de los casos de hepatitis agudas con los de hepatitis crónicas	102
5. Comparación de los familiares con CI HbeAc+ respecto a los CI HbeAg+	103
6. Agregación familiar	104
7. Infección por el VHD	104
B. Estudio serológico de familiares con marcadores atípicos	105
1. Familiares con HbcAc aislado	105
2. Vacunación natural	106
C. Programa de vacunación	106
1. Aceptación y tasas de respuesta	108
2. Amplitud de los estudios de familiares	109
- <b>Conclusiones</b>	111
- <b>Bibliografía</b>	114

## PROLOGO

El virus de la hepatitis B (VHB) continúa presentando hoy en día una gran importancia a nivel mundial. Basta decir que se calcula que hay mas de 200 millones de portadores crónicos (PC) en el mundo. En esta tesis doctoral vamos a realizar una revisión de distintos aspectos del virus, comenzando por un recuerdo histórico para seguir con breves comentarios sobre virología, clínica y patogénesis, y centrándonos finalmente en aspectos diagnósticos y epidemiológicos, objetivos principales de la misma. En cuanto a los **aspectos epidemiológicos** tratamos con especial énfasis la difusión intrafamiliar del virus, concediéndole un apartado independiente, ya que el origen del trabajo lo situamos en un proyecto conjunto Insalud-Comunidad Autónoma de Madrid para vacunar a familiares de PC del Area Sanitaria Leganés-Fuenlabrada. La puesta en marcha se realizó desde el Servicio de Microbiología del Hospital Severo Ochoa en 1989 y ha finalizado en Mayo de 1995, al trasladar esta tarea a Atención Primaria. En relación a los **aspectos diagnósticos**, estudiamos en detalle el problema del anticuerpo frente al core (HbcAc) como único marcador.

## OBJETIVOS

En esta tesis doctoral se van a tratar múltiples aspectos del diagnóstico y de la transmisión intrafamiliar del VHB, podemos destacar dos objetivos principales del trabajo:

1. Estudio epidemiológico de la transmisión intrafamiliar del VHB con la incorporación del subtipado del virus.

Además de ser el estudio mas amplio publicado hasta la fecha sobre este tema, incorporamos como principal innovación el subtipado del virus mediante un método serológico sencillo, que lo convierte en una herramienta epidemiológica de gran valor, asequible a la mayor parte de los laboratorios.

2. Estudio de la problemática del diagnóstico mediante anticuerpos frente al core del virus (HbcAc).

Enfocado fundamentalmente a cuando aparece como único marcador, desde una triple vertiente:

- Aparición de respuesta anamnésica tras la administración de una dosis de vacuna

- Tratamiento del suero con agentes reductores (metabisulfito) para eliminar falsos positivos

- Presencia de ADN del virus mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

## INTRODUCCION

### 1. Recuerdo histórico del Virus de la hepatitis B

Los primeros casos de la "hepatitis sérica", llamada así por ser una hepatitis aguda con un largo periodo de incubación que aparece tras la exposición percutánea con material que contenga suero humano, fueron descritos en Bremen en 1931<sup>1</sup>. Se trataba de trabajadores de un astillero que habían recibido la vacuna de la viruela fabricada con linfa humana.

Posteriormente se observaron repetidos casos, sobre todo después de usar agujas y jeringas contaminadas, por ejemplo en diabéticos<sup>2</sup>, en clínicas de enfermedades de transmisión sexual<sup>3-5</sup>, cuando se administraba plasma para la inmunoprofilaxis del sarampión<sup>6</sup> y la parotiditis<sup>7</sup>, en la administración de vacunas que contenían suero humano<sup>8,9</sup> y después de transfusiones sanguíneas<sup>10,11</sup>. Aunque hoy en día conocemos otros agentes, como el virus de la hepatitis C (VHC), que pudieron ser responsables de algunos de estos casos, indudablemente la mayoría fueron causados por el virus de la hepatitis B (VHB).

La "hepatitis sérica" no se distinguió claramente de la "hepatitis infecciosa", causada por el virus de la hepatitis A (VHA), hasta los años 40-50 cuando se descubrieron diferencias biológicas y antigénicas<sup>12-18</sup> que se demostraron con estudios de transmisión experimental en voluntarios.

A partir del descubrimiento del antígeno Australia en 1965



por Blumberg<sup>19</sup>, se consigue identificar y caracterizar el VHB. Este antígeno, hoy en día denominado de superficie (HBsAg), fue descubierto en el suero de un aborigen australiano, al formarse una línea de precipitado por difusión en agar al enfrentarlo al suero de un hemofílico que había recibido múltiples transfusiones. No se identificó como un antígeno viral hasta años mas tarde<sup>20-22</sup> y permanece hoy en día como el marcador mas útil de infección activa.

El desarrollo de ensayos serológicos para los distintos antígenos y sus respectivos anticuerpos ha dado a conocer la distribución mundial del VHB, con tasas de infección extremadamente altas en algunas partes de Asia, Africa y Oceanía<sup>23</sup>, y constituye en la actualidad un problema socio-sanitario de gran magnitud. Basta con decir que hoy en día se especula que existen mas de 200 millones de portadores crónicos del virus en el mundo<sup>23</sup>.

## 2. El virus

Es un virus ADN pequeño con unas características únicas en cuanto a su ultraestructura y propiedades antigénicas y biológicas, que hacen que se incluya en una familia distinta a las anteriormente conocidas, la Hepadnaviridae<sup>24,25</sup>. Recientemente se han caracterizado otros virus similares en marmotas en el este de Estados Unidos<sup>26</sup>, en ardillas en California<sup>27</sup> y en patos de Pekin en China y Estados Unidos<sup>28</sup>, y han sido incluidos en esta familia<sup>25,29</sup>. Tienen en común la estructura del ADN (pequeño, circular y con una parte monocatenaria), el mecanismo de replicación y la presencia de una enzima con propiedades de

transcriptasa inversa. En cuanto a sus propiedades biológicas destaca el tropismo hepático y la tendencia a causar infecciones persistentes.

Las primeras partículas virales fueron observadas por Bayer et al en 1968<sup>30</sup>, y eran pequeñas esferas heterogéneas de 15-25 nm, llamadas partículas de 22 nm, y otras mas alargadas de 22 nm por 20-200 nm. Estas partículas son las que mas frecuentemente se encuentran en el suero de pacientes infectados y estan compuestas de proteína, carbohidrato y lípido, ya que no contienen ácidos nucleicos. Hoy en día se consideran partículas virales incompletas que contienen antígeno de superficie. Sería Dane et al en 1970<sup>31</sup> el que describiría el virión completo al cual se denominó partícula de Dane.

El virión completo tiene un diámetro aproximado de 42 nm, con una envoltura lipídica de 7 nm de ancho y una nucleocápside o core esférica de 28 nm de diámetro. La superficie posee determinantes antigénicos (HBsAg) que forman las partículas virales incompletas<sup>31,32</sup>. Con detergentes no iónicos se puede liberar la nucleocápside que contiene el HBcAc o antígeno específico del core<sup>32</sup> y el ADN<sup>33</sup>, que está unido covalentemente a un polipéptido con actividad ADN polimerasa y proteínquinasa<sup>34,35</sup>. Además hay un tercer antígeno asociado a la infección por VHB, el HBeAg<sup>36</sup>.

En cuanto a la infectividad del virus podemos decir que es elevada, y los sueros pueden ser infectivos durante 6 meses almacenados a 30-32°C y hasta de 15 años si están congelados a -20°C<sup>37</sup>. A 60°C se pierde cuando pasan 10 horas pero no con 4 horas<sup>38</sup>. También se logra con 20-60 minutos a 90°C<sup>39</sup> o con una

hora de calor seco a  $160^{\circ}\text{C}^{40}$ . Algunos sueros HBsAg+ son infectivos a diluciones de  $10^{-7-8}$  mientras que otros no lo son incluso sin diluir<sup>41-43</sup>, lo que sugiere que algunos portadores crónicos únicamente poseen partículas virales incompletas en suero<sup>42</sup>. La concentración de estas partículas en suero puede ser de  $10^{13}/\text{ml}$  ( $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) o mayor<sup>44</sup> y generalmente es  $10^4$  veces mayor que la del virión completo.

## 2.1.- Estructura del virus

### 2.1.1.- Genoma

El ADN es pequeño (2,1 Kd), circular y de doble cadena salvo en una porción que varía en tamaño y puede ser desde un 15 a un 60% de la longitud total<sup>55,56</sup>. La actividad ADN polimerasa repara el fragmento monocatenario hasta convertirlo en ADN bicatenario de unos 3200 pares de bases (pb), iniciándose la reacción en el extremo 3' hasta llegar al 5' de la cadena corta (S+). La cadena larga (L-) no es completamente un círculo cerrado pero existe un "nick" a 300 pb del extremo 5' de la cadena corta<sup>80,83</sup>. Un polipéptido está covalentemente unido al extremo 5' de L- y funciona como "primer" en la replicación del ADN<sup>57,58</sup>. Esta estructura del ADN es exclusiva de la familia Hepadnaviridae. La detección de ADN es la única técnica que detecta directamente al virus completo, ya que como se ha descrito anteriormente en la sangre hay partículas incompletas que pueden existir sin viremia. El ADN del VHB ha sido clonado en bacterias y se conoce su secuencia de nucleótidos en su totalidad<sup>58,59</sup>). Consta de 4 fragmentos abiertos de lectura (ORFs) en la cadena L-, y se denominan S, C, X y P, que se representan en la figura 1. El ORF S codifica el HBsAg, el C contiene la

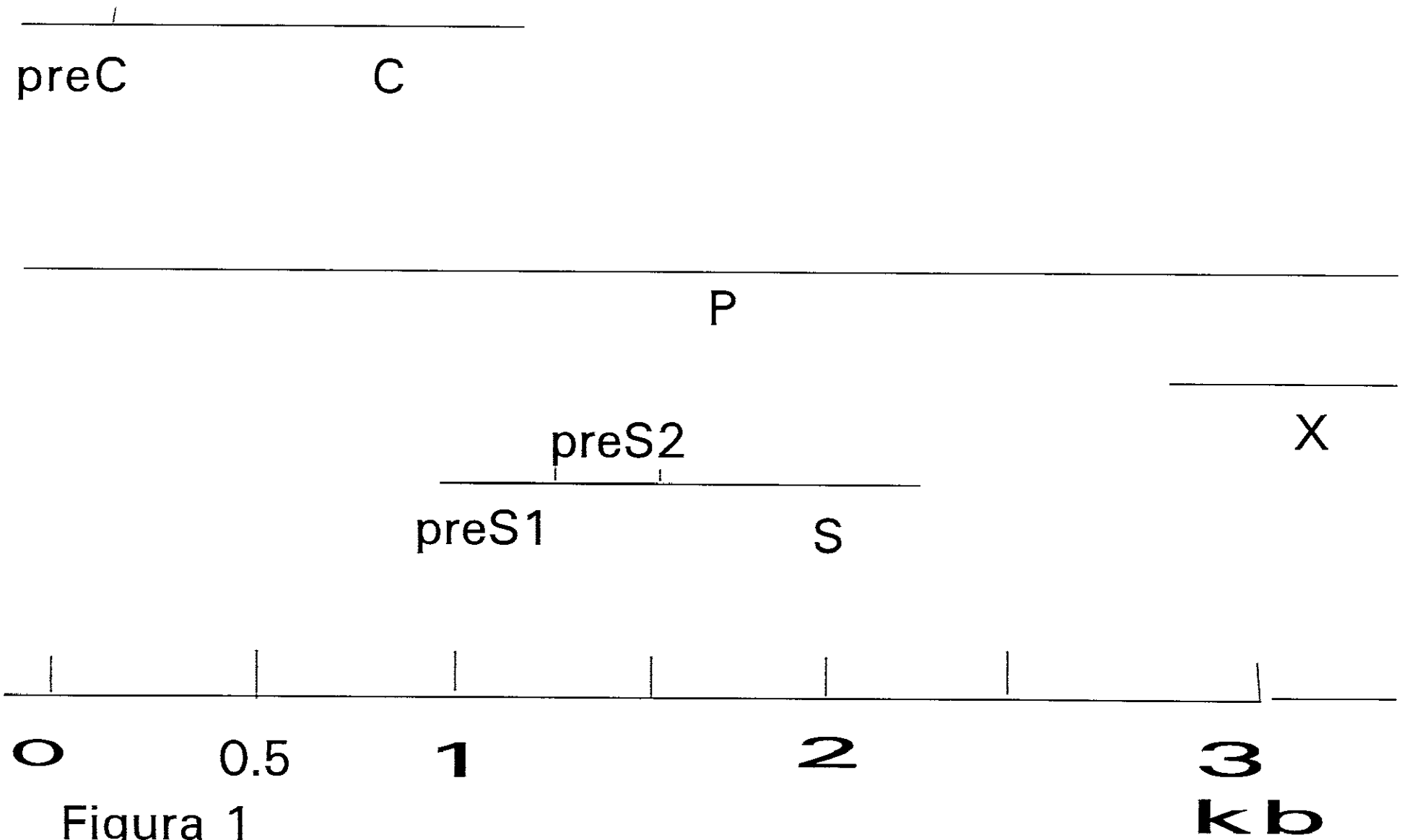


Figura 1

# REPRESENTACION DEL GENOMA DEL VHB

secuencia de nucleótidos que dan lugar al polipéptido mayor del core (HBcAg) y al antígeno e (HBeAg). El fragmento mayor es el P, que se superpone al gen S y dará lugar a la polimerasa. Por último el menor de ellos, el X, cuya misión en la replicación no está clara, pero puede activar secuencias de control transcripcional del virus y de la célula.

La replicación en los hepadnavirus envuelve un paso de transcripción reversa, algo único en los virus ADN (junto con el virus del mosaico de la coliflor), y que se conocía únicamente para los retrovirus. Esta homología podría deberse a antecedentes filogenéticos de ambas familias<sup>60</sup>. De hecho las tasas de mutación de los virus de esta familia se sitúa en un lugar intermedio entre los virus ARN y ADN<sup>239</sup>.

Además el ADN puede integrarse en la célula en forma de episomas y replicarse, aunque aparentemente el S es el único gen que se expresa<sup>61</sup>.

#### 2.1.2.- Antígeno de Superficie

El antígeno de superficie es complejo y este hecho se refleja en su correspondiente anticuerpo. Al menos hay 5 especificidades antigénicas en las partículas HBsAg. Hay un determinante específico de grupo, el a, y dos pares de determinantes de subgrupo, d,y y w,r, generalmente exclusivos, comportándose como alelos<sup>45,46</sup>. Se ha descrito la heterogenicidad del determinante w, así como otros distintos como el q, x o g<sup>47,48</sup>. Los 8 subtipos habituales son el ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4 y adr<sup>48</sup>. Hay combinaciones inusuales como la awr, adwr, adyw adyr o adywr, generalmente descritas en el SE

Asiático y en casos únicos, lo que sugiere que el fenómeno sea causado por recombinaciones genéticas atípicas en infecciones mixtas<sup>48</sup>. La detección de los distintos subtipos virales presenta un valor epidemiológico principalmente (ver apartado 6.3), y se puede realizar por métodos serológicos convencionales o mediante PCR, siendo esta última de gran valor para investigar subtipos virales atípicos<sup>237,238</sup>.

El gen S contiene tres regiones: preS1, preS2 y S (Figura 2).

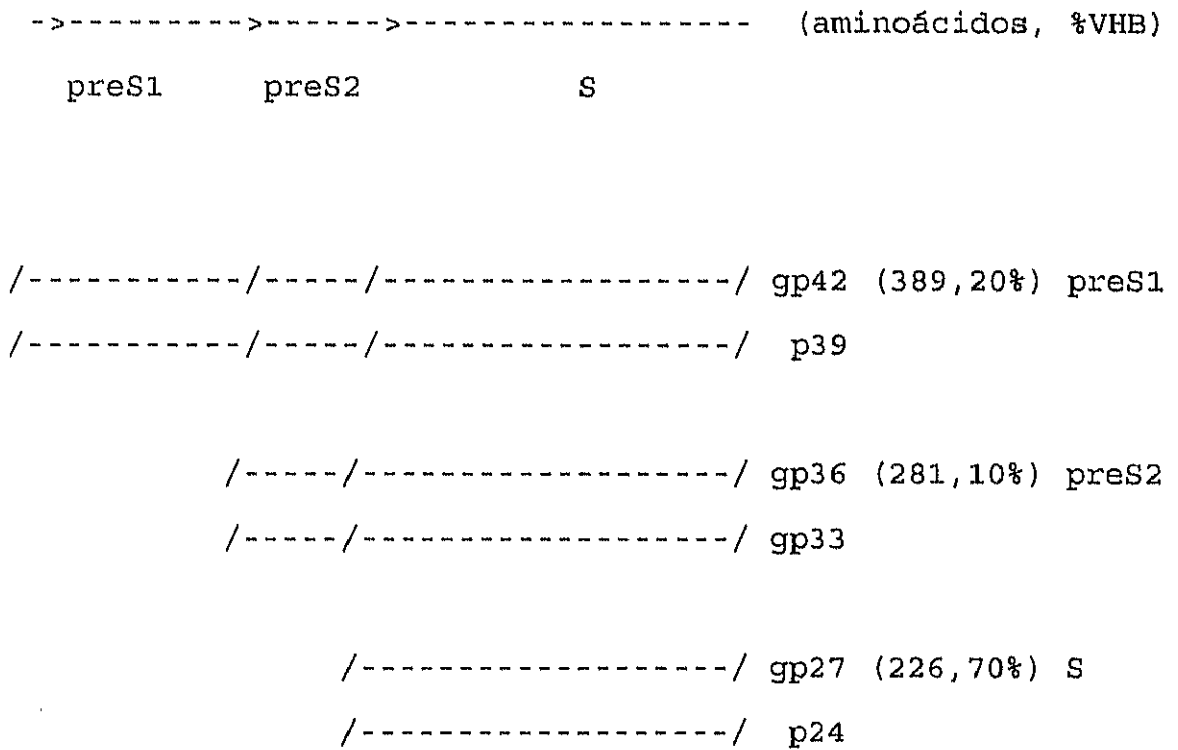


Figura 2. Expresión de las proteínas de superficie del ADN del VHB<sup>54</sup>.

El componente proteico mayor del virión y de las partículas de 22 nm es un péptido de 226 aminoácidos, con 27 Kd ó 24 Kd según se trate de la forma glicosilada o no, codificado por la región S. Se trata del determinante de grupo a y de los subgrupos de HBsAg. Menos abundantes son polipéptidos de mediano tamaño (33 y 36 Kd) que contienen 55 aminoácidos de la secuencia preS2, y otros mas grandes (39 y 42 Kd) con diferentes tamaños según los subtipos (165-221 aminoácidos), codificados por la secuencia preS1. Estos últimos se encuentran en mayor cantidad en los viriones y en las partículas alargadas que en las de 22 nm esféricas. Por el contrario los de mediano y pequeño tamaño son mas abundantes en estas últimas<sup>50</sup>. Muchos epitopos contenidos en las regiones preS1, preS2 y S se encuentran en la superficie de estas partículas y dan una respuesta inmune protectora frente al virus<sup>51</sup>.

La detección de HBsAg es el marcador de infectividad mas utilizado en la actualidad. El valor de preS1 y preS2 como marcadores serológicos y el de sus correspondientes anticuerpos, anti-preS1 y preS2, continúa en investigación en la actualidad y son numerosos los trabajos que tratan sobre el tema<sup>96-99</sup>. Parece ser que tienen un valor como marcadores mas precoces que el HBsAg para la predicción de curación o cronicidad, y lo mismo que este están relacionados con el nivel de replicación viral<sup>138,240</sup>. Además se investiga en ellos como antígenos para el desarrollo de nuevas vacunas con mayor poder de inmunogenicidad<sup>240-242</sup>.

### 2.1.3.- Core o nucleocápside

El core contiene el HBcAg, que no se está libre en sangre sino como un componente interno del virión. Tiene un único polipéptido predominante de aproximadamente 19Kd, codificado por el gen C<sup>52,53</sup>. La actividad proteín quinasa fosforila este polipéptido y no otros. No se han descrito variaciones o heterogenicidad antigénica, aunque recientemente se han caracterizado dos regiones antigénicas, una mayor, situada en la región central, y otra menor<sup>243</sup>.

La detección de anticuerpos frente al core es el marcador epidemiológico por excelencia, ya que es el anticuerpo mas duradero y está presente en casi todos los modos de infección del virus. Por otra parte la detección de IgM específica es el método de diagnóstico de la hepatitis aguda. Su presencia de bajo nivel en hepatitis crónica se puede correlacionar con el nivel de replicación viral<sup>109</sup> aunque hoy en día se especula sobre una posible asociación con el nivel actividad histológica.

### 2.1.4.- Antígeno e

Fue descubierto en 1972 y es antigénica y físicamente diferente al HBsAg y al HBcAc<sup>62</sup>. Es un antígeno soluble que frecuentemente va unido a inmunoglobulinas<sup>63</sup>, y está incluido en un fragmento de 17,5 Kd del polipéptido estructural del core. Por tanto está codificado por el gen C. El HBeAg es liberado del core cuando se disgrega con detergentes, reaccionando el polipéptido de 19 Kd del core con anti-HBe; de modo que el HBcAg tiene distintas especificidades antigénicas antes y después del tratamiento con detergentes<sup>64</sup>.

Hay una gran correlación entre la presencia de HBeAg en



suero y la concentración de viriones, y por lo tanto de la capacidad infectiva<sup>65</sup>, lo que sugiere que los viriones y el HBeAg se producen conjuntamente en los hepatocitos.

Recientemente se ha descrito que de las tres formas de HBeAg que se pueden detectar (P16, P18 y P20) es la P16 la que se asocia a cronicidad<sup>100</sup>.

Estos criterios clásicos se han visto modificados en parte por la aparición de mutantes de precore, en los cuales no se produce HbeAg pero presentan alto nivel de replicación. Esto ocurre por una mutación en esta región que da lugar a un codon de terminación (TAG) que impide la transcripción del gen C completo y por lo tanto la síntesis del antígeno e<sup>209,210</sup>. Se da frecuentemente en zonas del Mediterráneo<sup>213</sup>, incluido nuestro país y se asocia a una peor evolución<sup>211,212</sup>. En ocasiones se ha relacionado con el desarrollo de hepatitis fulminante<sup>244</sup>.

#### 2.1.5.- Antígeno X

El ORF de esta región codifica una proteína de 154 aminoácidos denominada X<sup>93</sup>. Este antígeno está cobrando importancia en la actualidad debido a sus propiedades de transactivador de otros virus<sup>89,90</sup>, y más concretamente por su posible interrelación con el virus de la inmunodeficiencia humana<sup>221,222</sup>. Esta propiedad puede ser de gran importancia en la patogénesis de la infección crónica, jugando un papel importante en la integración del ADN del virus en el genoma del huésped<sup>92,93</sup>.

Se ha demostrado que existe una respuesta serológica frente a los determinantes HBx que sugieren que los genes de la región X codifican por una proteína expresada durante la infección por el virus y que es reconocida por el sistema inmunitario del

huésped<sup>91</sup>.

En cuanto a la significación de la respuesta inmunitaria en el curso de la infección no está totalmente aclarado, pero parece ser que hay una relación en hepatitis crónica con el nivel de replicación viral<sup>91,92</sup>.

## 2.2- Tropismo

En un principio se pensó que el hepatocito era la única célula que infectaba el VHB<sup>66</sup>, y se tomó como evidencia el conseguir la erradicación después de un transplante hepático<sup>69</sup>. Posteriormente se detectaría HBsAg en jugo pancreático de algunos pacientes, detectándose HBsAg y HBcAg en células pancreáticas<sup>67</sup>. También se ha detectado ADN del VHB en leucocitos<sup>68</sup>, aunque son los hepatocitos las células mas permisivas y mas frecuentemente infectadas.

En cuanto al huésped el rango es estrecho y probablemente esté restringido a primates y humanos.

Muy recientemente se ha identificado un posible receptor para el virus, que sería el de la transferrina, demostrando Franco et al que es el mediador en la penetración y presentación del antígeno de superficie del virus en los linfocitos T<sup>94</sup>.

## 3. INFECCION

Los estudios llevados a cabo en infecciones naturales en humanos e infecciones experimentales en humanos y chimpancés<sup>12,13,16,18</sup> han definido una serie de patrones de infección del VHB. La mayoría de las infecciones primarias-entre un 90 y 95%- son autolimitadas y se resuelven completamente en menos de

6 meses del inicio del cuadro. Así mismo la mayoría de estas infecciones son subclínicas y son detectadas únicamente por ensayos serológicos. De un 5 a un 10% de los casos se convierten en infecciones persistentes que pueden durar muchos años o de por vida. Se considera que esto ocurre cuando se detecta HBsAg pasados 6 meses del inicio de la sintomatología. La mayoría de los pacientes con infecciones persistentes van a tener en sangre partículas incompletas y completas del virus, pero en ocasiones únicamente hay formas no infecciosas.

### 3.1.- Infección primaria autolimitada

El primer marcador en aparecer va a ser el HBsAg, que se puede considerar como sinónimo de infección activa cuando el ensayo se confirma por métodos de neutralización. Puede detectarse ya en la primera o segunda semana<sup>104</sup> o demorarse hasta la undécima o duodécima<sup>105</sup>. La media de la aparición de la sintomatología es de 4 semanas después de que aparezca (rango 1-7)<sup>106</sup>. Suele permanecer detectable de una a seis semanas<sup>106</sup>, pero puede llegar a 20<sup>105</sup>. Los pacientes que lo presentan durante menos de 7 semanas raramente desarrollan una hepatitis sintomática, mientras que la severidad en la sintomatología se correlaciona con la duración de la positividad de HBsAg<sup>105</sup>. Aunque normalmente descienden los títulos simultáneamente a los síntomas y desaparece posteriormente a que el paciente haya resuelto la hepatitis, en un 9% de los pacientes ya es negativo antes del inicio de la hepatitis y en un 28% antes de que se resuelvan los síntomas<sup>105</sup>. Otro marcador precoz es el HBeAg detectado por métodos muy sensibles como el radioinmunoensayo (RIA),

apareciendo simultáneamente o a los pocos días del HBsAg<sup>107</sup>, y declina paralelamente a este, apareciendo su correspondiente anticuerpo, HBeAc, que suele perdurar de uno a dos años<sup>104</sup>. La persistencia de HBeAg por mas de 10 semanas es pronóstico de infección crónica<sup>108</sup>. El tercer marcador que aparece es el ADN y los viriones con actividad ADN polimerasa, detectables por hibridación o actividad de la polimerasa, que aparecen inmediatamente después del HBsAg, alcanzan altas concentraciones en la incubación tardía y decaen con la aparición de los síntomas<sup>109,110</sup>. Esta perspectiva ha cambiado en la actualidad con la aparición de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la detección del ADN viral y que ha pasado a ser el método mas sensible de detección de infección por el VHB<sup>95</sup> y será tratado en el apartado 5. Este método puede cambiar los patrones clásicos de infección, ya que se ha detectado virus en pacientes con seroconversión a HBsAc<sup>96</sup> o en pacientes con hepatitis fulminante seronegativa para el VHB<sup>97</sup> que se habían etiquetado como no A no B<sup>98</sup>.

El cuarto marcador que aparece prácticamente en la totalidad de los pacientes (para excepciones ver las referencias 122 y 123), es el HBeAc, que suele hacer su aparición de 3 a 5 semanas de la aparición del HBsAg y antes de debutar la sintomatología<sup>104,105</sup>. Además los anticuerpos del tipo IgM son de diagnóstico de hepatitis aguda y en el 40% de los pacientes declinan rápidamente, aunque pueden permanecer hasta 2 años en el 20% de los pacientes con este tipo de infección<sup>111</sup>.

El HBsAc aparece durante la antigenemia y previo a la sintomatología en un 10-20% de los enfermos que desarrollan rash

y artritis asociada a la formación de inmunocomplejos<sup>111</sup>, pero normalmente aparece tras la desaparición del HBsAg. Esto se puede demorar durante un tiempo o incluso no llegar a aparecer<sup>105,110</sup>. Al contrario que ocurre con el HBcAc, los mayores títulos se asocian a un periodo menor de antigenemia<sup>105</sup>.

### 3.2.- Infección persistente

Se considera que ocurre cuando se detecta HBsAg durante mas de 20 semanas, y se va a etiquetar a los pacientes como portadores crónicos del virus (PC). Los niveles de HBsAg se van a asociar a mayores niveles virales, aunque hay también otra serie de marcadores como son los pre-S, HBeAg, HBxAc, IgM-HBcAc, ADN polimerasa y los que detectan genoma viral-hibridación y PCR- que nos permiten conocer la actividad viral<sup>99,101</sup>. El marcador clásico de infectividad era el HBeAg, aunque como ya se ha mencionado anteriormente los mutantes de precore pierden este marcador manteniendo altos niveles de replicación<sup>102,103</sup>.

Aunque la historia natural de este tipo de infección no está completamente definida, la norma es una infección prolongada para la mayoría de los PC. El aclaramiento espontáneo del HBsAg tiene una tasa inferior al 2%/año<sup>113-115</sup>.

Existen evidencias de este tipo de infección en pacientes sin niveles detectables de HBsAg<sup>105</sup>, que pueden ser causantes de hepatitis B postransfusionales. Así mismo pueden padecer hepatitis crónica<sup>116</sup>.

### 3.3.- Inmunidad

La presencia de HBsAc se considera como protectora de

reinfección. Aunque primariamente es anti-a específica, también puede aparecer anti-d o anti-y, siendo la mas importante la primera ya que se ha demostrado la inmunidad frente a distintos subtipos<sup>117</sup>. Hay casos excepcionales de reinfección en algunos casos por ser de especificidad restringida<sup>118-120</sup>. También se ha visto en chimpancés la reinfección con altas dosis de virus del mismo subtipo<sup>117</sup> y están descritos los mutantes de escape a la vacuna por mutaciones en la región del determinante común<sup>223, 224</sup>, que incluso está descrita su transmisión por vía vertical<sup>245</sup> o en las primeras etapas de la vida<sup>246</sup> a pesar de una inmunoprofilaxis correcta. También se ha notificado la protección en pacientes con HBcAc aislado<sup>105</sup>, consiguiéndose la inmunización de chimpancés con HBcAg<sup>121</sup>. Además HBeAc parece tener también cierta actividad protectora<sup>124</sup>, por lo que este capítulo aún no está cerrado.

#### 4. PATOGENESIS

Para no alargar demasiado esta exposición, no entraremos en detalles sobre la patogénesis y manifestaciones clínicas del virus, de las cuales hay numerosos tratados ya escritos.

Los síndromes mas frecuentemente asociados a la infección del VHB son la hepatitis aguda y crónica. La infección aguda puede ser desde asintomática hasta fulminante. En cuanto a la sintomatología clínica es común a la que ocurre en otras hepatitis por lo que se ha de confirmar por métodos serológicos.

Las infecciones persistentes se pueden asociar a una

histología hepática normal o con mínimos cambios, o a síndromes denominados hepatitis crónica persistente (HCP) o hepatitis crónica activa (HCA), siendo esta última mas severa y progresando a cirrosis (CH).

El mecanismo de daño hepático no está completamente dilucidado, jugando un papel importante la respuesta inmune del huésped<sup>136-137</sup>. Hay una serie de factores asociados a la virulencia como son la dosis infectiva<sup>139</sup>, que se correlaciona con un menor periodo de incubación y una mayor severidad de la hepatitis, y la edad del paciente<sup>140</sup>, siendo mas suaves a menor edad. Esto también ocurre en huéspedes con inmunodeficiencias<sup>141-142</sup>, lo que apoya las tesis de que la respuesta inmune es fundamental en la patogénesis del virus. De modo que son infrecuentes las hepatopatías crónicas tras una hepatitis aguda en adultos inmunocompetentes<sup>247</sup>.

Otra enfermedad asociada a la infección persistente es el carcinoma hepatocelular (CHC), donde cada vez hay mas evidencias del papel etiológico del VHB<sup>143,205</sup>, habiéndose publicado recientemente una revisión sobre el tema <sup>144</sup>.

En cuanto a los síndromes asociados a manifestaciones extrahepáticas causadas por la infección del virus la mayor parte son causadas por la formación de inmunocomplejos.

## 5. DIAGNOSTICO

Es fundamentalmente serológico y ya se ha tratado previamente sobre los marcadores del virus, siendo los ensayos mas utilizados en la actualidad de tipo ELISA, con las siguientes pautas:

Detección de HbsAg como marcador de infecciosidad

Detección de HbcAc como marcador epidemiológico

Detección de HbsAc como marcador de inmunidad

Detección de HbeAg/HbeAc como marcador de nivel de replicación viral

Detección de HbcAc-IgM como marcador de infección aguda

Las posibles interpretaciones de los perfiles serológicos mas frecuentemente encontrados se exponen en la tabla I. Para la interpretación de otros perfiles atípicos, que llevaría mucho tiempo comentar, se puede consultar bibliografía mas especializada<sup>126, 127, 108</sup>. Incluso podemos encontrar descritos casos de infección crónica HbcAc negativo<sup>122, 123, 248</sup>.



ANTIGENOS		ANTICUERPOS			INTERPRETACION
HBs	HBe	HbC IgG IgM	HBe	HBs	
+	-	- -	-	-	Fase precoz de la infección aguda
+	+	- -	-	-	
+	+	- +	-	-	
+	+	+ +	-	-*	Hepatitis B aguda
+	-	+ +	+	-	
-	-	+ +	+	-	Convalecencia Algunas infecciones agudas
-	-	+ -	+	+	Resolución de la infección (Pasado reciente) Contaminación pasiva
-**	-	+ -	+	-	
-	-	+ -	-	+	Infección en un pasado distante Contaminación pasiva
-	-	+ -	-	-	
+	+	+ -+	-	-*	Portador crónico Alta replicación
+	-	+ -+	-	-	Portador crónico
-	-	- -	-	+	Inmunización activa (Natural o vacuna) o pasiva

Tabla I. Interpretación de los principales perfiles serológicos

\*En ocasiones coexisten HBsAg y HBsAc

\*\*Cabe la posibilidad de portadores silentes (ver apartado

3)

Realmente el único marcador que nos permite detectar virus completo es la detección de ADN. Clásicamente se ha realizado por métodos de hibridación, que siguen siendo el método estandar para cuantificar la viremia que es de gran utilidad en la monitorización del tratamiento con interferón. Recientemente se ha introducido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)<sup>125</sup> y otras técnicas de biología molecular como la hibridación del ADN ramificado, la reacción en cadena de la ligasa y métodos de

hibridación líquida o en membrana, siendo la técnica mas sensible la PCR<sup>95,135</sup>. En síntesis la técnica consiste en desnaturalizar el ADN, añadir unos "primers" específicos del ADN buscado que en condiciones adecuadas hibridarán, actuando a continuación una polimerasa de ADN (Taq polimerasa) que elongará las cadenas. Repitiendo el proceso en sucesivos ciclos se consigue una amplificación exponencial del ADN<sup>133</sup>. Se ha descrito que mediante este método se pueden llegar a detectar de 3 a 30 viriones<sup>128,131</sup>. Esta enorme sensibilidad no está exenta de complicaciones técnicas y posibilidad de falsos resultados, para lo cual se han descrito una serie de precauciones que hay que llevar a cabo<sup>111,112</sup>. Esta técnica puede hacer cambiar algunos de los criterios clásicos de interpretación serológica. Así se han descrito casos de pacientes con hepatitis crónica HbsAg- y HbsAc+ (teóricamente inmunes) en los cuales se ha detectado ADN viral<sup>128,146,187</sup>, probablemente causados por mutantes de escape a la respuesta inmune. También hay casos de hepatitis postransfusional a partir de donantes HbsAg-<sup>130</sup>. Aunque actualmente sea una técnica de investigación, puede presentar una gran aplicación como marcador mas sensible de infecciosidad.

Otro marcador de gran interés es el HbcAc que como ya se ha expuesto indica contacto con el virus y es el que permanece por mas tiempo detectable, por lo que se suele utilizar como cribado para estudios de vacunación. La problemática surge cuando aparece en sangre solo este marcador (HbsAg- HbcAc+ HbsAc-), no recomendándose habitualmente la vacunación del paciente. Pero este marcador puede presentar problemas serológicos y frecuentemente se obtienen resultados falsamente positivos<sup>145,215</sup>,

generalmente asociados a un bajo nivel de reactividad<sup>216-218</sup>. De ahí que algunos autores recomienden la administración de una dosis de vacuna obteniendo una respuesta anamnésica en aquellos pacientes que previamente han sido infectados por el virus (títulos altos de HbsAc), mientras que si fuese un falso positivo la respuesta inmunológica será de tipo primario (títulos bajos o ausente)<sup>249-252</sup>. Por lo tanto este es un tema que ha cobrado gran interés en la actualidad y que será abordado en este trabajo, y que presenta cierta controversia.

Algunos autores lo encuentran de gran utilidad con un 35% de respuestas anamnésicas y descartando infección crónica en el 75% de los pacientes, ya que otro 40% presentó una respuesta primaria<sup>249</sup>. Para otros esta dinámica es insuficiente ya que detectan respuestas no anamnésicas en sujetos con infección pasada<sup>250</sup>, o encuentran que no aporta ningún dato adicional respecto al diagnóstico convencional en pacientes cirróticos<sup>251</sup>, o bien encuentran unas tasas muy bajas de este tipo de respuesta (3.5%) aún usando un método EIA + RIA, por lo que concluyen que la baja especificidad de la detección de HbcAc aislado obliga a vacunar a estos pacientes<sup>252</sup>.

Por otra parte también ha sido descrito este perfil para portadores "silentes" del virus, cuyo nivel de HbsAg es indetectable. La aplicación de la PCR a este grupo de pacientes puede ser de utilidad para constatarlo, y algunos autores han cifrado la tasa de portadores crónicos del virus con este perfil en un 9%<sup>149</sup>, encontrando otros que hasta un 60% de los sujetos con HbcAc aislado presentaban ADN en suero<sup>253</sup>, aunque en estudios realizados en países de alta endemicidad. Así mismo en este tipo

de países se ha descrito que en torno a un 60% de los no respondedores a la vacunación pueden presentar este perfil serológico con presencia de ADN viral e infección latente<sup>147</sup>. En nuestro país también se han descrito casos con este perfil y ADN viral en hepatopatías crónicas asociadas a VHC<sup>149</sup>. Este perfil aunque es infrecuente en población general (<5%), es muy frecuente en ADVP<sup>144</sup>. Por lo tanto la detección de virus en sujetos con HbcAc aislado presenta un gran interés, no solo como instrumento diagnóstico o para medidas de vacunación, sino también para la prevención de hepatitis postransfusionales en los bancos de sangre, por lo que será un tema que abordemos en este trabajo.

Para la discriminación de falsos resultados HbcAc+, además de los ensayos tipo "booster" descritos, se están estudiando distintos métodos serológicos, destacando el tratamiento del suero con agentes reductores antes de realizar el ELISA, que puede ser una alternativa para el futuro ya que se ha descrito que puede discriminar un gran número de falsos positivos<sup>219, 220, 257</sup>. Los principales agentes que se están investigando son el metabisulfito (MBS), que será ensayado y evaluado en este trabajo, por ensayos EIA y RIA (Radioinmunoensayo), la cisteína por ensayo CLIA (Quimioluminiscencia) por la Casa Comercial Abbott, y el dietiltiotreitól (DTT) mediante ensayo EIA por la Casa Comercial Boehringer Mannheim. Por ejemplo Weare et al encuentran en un panel de 81 sueros débilmente reactivos, que de los 54 sensibles al agente reductor solo uno presentaba HbsAc mientras que este anticuerpo aparecía en 21 de los 27 sueros resistentes a la reducción<sup>220</sup>. Cabe resaltar la pérdida de

actividad de los anticuerpos de clase IgM por lo que no se utilizarán estos agentes en este tipo de ensayos.

Otro método ensayado ha sido el estudio de las clases y subclases de HbcAc, que aunque presenta buenos resultados tiene una mayor complejidad técnica y coste económico que el método anterior<sup>215</sup>

Por último otro perfil serológico atípico es la aparición de HbsAc aisladamente que en sujetos que no han recibido vacunas, lo que implica una "vacunación natural" (contacto con partículas defectivas del virus) de la que hablaremos en el apartado 7.

## 6. EPIDEMIOLOGIA

### 6.1- Incidencia de la infección primaria

Se calcula que hay unos mil millones de infectados con unos cincuenta millones de nuevas infecciones anuales. De entre los 200-300 millones de portadores crónicos 60 morirán por esta causa, a razón de 2 millones de muertes anuales<sup>83</sup>. Estarían distribuidas del siguiente modo: Hepatitis fulminante 100.000, hepatitis aguda 500.000, hepatitis crónica 400.000, cirrosis hepática (CH) 100.000 y hepatocarcinoma (HC) 300.000. El CDC estima que hay unos 300.000 nuevos casos de hepatitis B en EEUU y un millón de portadores crónicos de los cuales entre 4.000 y 6.000 evolucionan hacia CH ó HC. Las cifras son suficientemente significativas del grave problema socio-sanitario que supone la infección por este virus.

La mayoría de las hepatitis agudas en EEUU se dan en adultos jóvenes, a diferencia de la hepatitis A que se da en edades mas tempranas<sup>84</sup>. En cambio la incidencia de infección primaria por VHB ocurre con mucha mas frecuencia a edades tempranas en Asia y Africa debido a la implicación de distintas vías de transmisión<sup>84</sup>, como se expone en el punto 6.

Las principales diferencias del VHB con otros virus de la hepatitis (A,C,D y E) se exponen en la tabla II.

	A	B	C	D	E
TIPO	Picornavirus (RNA)	Hepadnavirus (DNA)	Flavivirus (RNA)	V.defectivo (RNA)	Calicivirus (RNA)
Incubación (días)	15-45	60-150	25-60	Coinfecc Sobreinf (VHB)	14-63
Transmisión	Horizontal (Oral-fecal)	Horizontal (Parenteral, ETS) Vertical	Parenteral	Parenteral	Oral-fecal
Localización	Mundial	Mundial	Mundial	Mundial	India Nepal Africa
Periodicidad	Otoño	Anual			
Presentación	Epidém. Esporád.	Esporád.	Epidém. Esporád.	Esporád.	Epidem. Esporád.
Cronicidad	No	Si (5-10%)	Si (50%)	Si (10%)	No
Curación	100%	90%	50%	90%	
Inmunidad	Homóloga	Homóloga	Homóloga		

Tabla II. Principales características de los virus de la hepatitis

En cuanto a la hepatitis postransfusional causada por virus B, durante la década de los 70 se consiguió una drástica reducción<sup>85,86</sup> con la implantación de la detección de HBsAg y de donantes voluntarios. Pero aún utilizando los tests mas sensibles todavía se le atribuyen entre un 5-10% de los casos <sup>86,189</sup> por lo que el HBsAg no detecta en todos los casos la potencial infecciosidad de la sangre.

En España la hepatitis vírica es una enfermedad de declaración obligatoria, aunque solo desde 1982 y sin especificar

el tipo de virus. En 1985 se declaran 45.000 casos, es decir 114/100.000, y desciende a 80 y a 61/100.000 en 1987 y 1988 respectivamente<sup>80</sup>. Las cifras mas altas correspondieron a Melilla y Ceuta (425 y 230/100.000) y la CAM con 255 en 1987 y 186 en 1988. Por el contrario la mas baja se presentó en Cataluña con 22/100.000.

La frecuencia de anti-HBs que indica infección pasada por virus B aumenta con la edad hasta los 35-40 años, tanto en EEUU<sup>81,84</sup> como en nuestro país<sup>87,82</sup> (Tablas III-V). En la tabla III se exponen los datos del CDC de EEUU, que sirven para clasificar a los distintos grupos de población en de alto, medio y bajo riesgo.

Riesgo	Grupo de población	%HBsAg	%Total*
ALTO	Inmigrantes de Areas de alta endemicidad	13	70-85
	Ingresados en Instituciones para retrasados mentales (IRM)	10-20	35-80
	ADVP	7	60-80
	Homosexuales	6	35-80
	Familiares de portadores	3-6	30-60
	Pacientes en hemodiálisis	3-10	20-80
	MEDIO	Presos	1-8
Personal de IRM		1	10-25
Personal Sanitario en frecuente contacto con sangre		1-2	15-30
BAJO	Personal Sanitario con escaso o nulo contacto con sangre	0,3	3-10
	Adultos sanos	0,3	35

Tabla III. Prevalencia de marcadores del VHB en diferentes grupos de población clasificados en función del riesgo en EEUU. Datos del CDC<sup>83</sup>.

\* Incluye todos los marcadores (HBsAg, HBcAc y HBsAc)



En nuestro país la tasa global de marcadores está situada entre el 20 y 30%<sup>81</sup>. En las tablas y se presentan los resultados de una encuesta seroepidemiológica llevada a cabo en la CAM en 1988<sup>87</sup>, comunidad en la que se sitúa nuestra Area Sanitaria.

Población investigada	22-35 meses	7-10 años	20-39 años	>55 años	Total
Tamaño muestral	281	463	519	518	1781
Anti-HBc (%)	11,4	9,1	22,4	34,7	20,8
HBsAg (%)*	0,4	1,5	2,9	2,3	2,0
HBeAg (%)**	100	20	6,7	0	9,4

Tabla IV. Seroprevalencia de marcadores del VHB por grupos de edad en la CAM<sup>87</sup>. (\* % referido al total de la muestra, \*\* % referido al total de HBsAg+).

Grupo de edad		22-35 meses		7-10 años		20-39 años		>55 años		Total	
N°	Glo bal	281		463		519		518		1781	
	Por sex	♂ 159	♀ 122	♂ 258	♀ 205	♂ 147	♀ 372	♂ 226	♀ 292	♂ 790	♀ 991
%	Glo bal	0,36 (0,01-1,98)		1,51 (0,60-3,12)		2,89 (1,58-4,74)		2,32 (1,20-4,03)		1,96 (1,38-2,76)	
	HBs Ag	♂ 0,0	♀ 0,8	♂ 0,8	♀ 2,4	♂ 4,8	♀ 2,1	♂ 1,8	♀ 2,7	♂ 1,6	♀ 2,2

Tabla V. Seroprevalencia del HBsAg por grupos de edad en la CAM<sup>87</sup>.

Por lo tanto en la CAM se estima que hay en torno a un 1,9% de portadores, mientras que un 21% presentaría algún marcador frente al virus<sup>81,87</sup>. Muy recientemente se ha publicado una nueva

encuesta epidemiológica de la CAM (año 1995), pero no hay diferencias significativas respecto a la del año 89 que hemos expuesto<sup>207</sup>.

En el Area Sanitaria Leganés-Fuenlabrada, donde se ha llevado a cabo este estudio, hemos estimado una tasa de portadores del 1,6% en base al estudio serológico que se realiza en embarazadas<sup>208</sup> y del 1.2 % según los datos del Banco de Sangre de nuestro Hospital.

La difusión del virus B está propiciada por la endemidad y por la existencia de unos grupos de riesgo:

- Familiares de portadores
- Recién nacidos de madres portadoras
- Presos
- Personal sanitario y personal de Centros Sanitarios que rutinariamente entre en contacto con sangre o fluidos corporales
- Pacientes en hemodiálisis
- Hemofílicos y pacientes que reciban transfusiones periódicas
- Odontólogos
- ADVP (adictos a drogas por vía parenteral)
- Prostitutas
- Homo o bisexuales con parejas no controladas
- Deficientes mentales ingresados en instituciones cerradas y el personal en contacto con ellos
- Viajeros a paíseas endémicos
- Personal de rescate y primeros auxilios, funcionarios de prisiones, policías, bomberos...
- Grupos marginales

El grupo en que se sitúa este estudio es el de familiares-conviventes de portadores, que se estima que son unos 270.000 en la CAM<sup>91</sup> de los cuales hemos estudiado 1475. La difusión intrafamiliar del virus B se estudia en profundidad en el apartado 7.

## 6.2.- Infección persistente o crónica

Es una de las infecciones virales persistentes mas comunes, con aproximadamente 200 millones de casos<sup>23,83</sup>, la mayoría de ellos en Africa y SE Asiático.

Según sea la tasa de portadores del virus se clasifican los países en de alta, media y baja endemicidad. Los de elevada endemicidad tienen tasa en torno al 5-15% o superior como China, SE Asiático, Islas del Pacífico, Sudamérica o el Africa Subsahariana. En estos países las altas tasas vienen condicionadas por las deficientes condiciones higiénico-sanitarias y la alta tasa de infección en las primeras etapas de la vida. Además también puede haber condicionantes genéticos y nutricionales. Nuestro país pertenece al grupo de endemicidad media, con tasas entre 0,5 y 2,5%, habiéndose estimado en 600.000 el número de portadores crónicos<sup>81</sup>. Por último se consideran países de baja endemicidad los que presentan tasas entre 0,1 y 0,5% como EEUU y Europa Occidental.

En Europa podemos considerar 3 patrones según el grado de infección:

- tipo I, Países Nórdicos (0,1% de HBsAg de la población)
- tipo II, Europa Central (0,1-1%)
- tipo III, Países Mediterráneos (1-5%)

Además de la incidencia de la infección primaria y de la edad a la que ocurre, influyen factores del virus y del hésped en el desarrollo del estado de portador. Se ha sugerido una implicación genética, basada en la aparición de numerosos portadores en agrupaciones familiares<sup>151-180</sup> con una posible

segregación como caracter autosómico recesivo<sup>70,71</sup>. Se ha encontrado una asociación con ciertos tipos de HLA<sup>72</sup>, pero en otras ocasiones no ha sido así<sup>73,74</sup>. Si hay evidencias en cuanto a una mayor predisposición de razas Asiáticas frente a la raza blanca, aunque el componente genético no se ha establecido aún<sup>75</sup>. Lo que sí está claro es que la hepatitis neonatal se asocia a infección persistente<sup>79,88,140</sup> además de que suele ser anictérica. Este hecho se asocia a la patogénesis del virus en sistemas inmunitarios no competentes. Esto se puede aplicar también a enfermos de diálisis<sup>76,141</sup>, síndrome de Down, lepra lepromatosa y leucemia linfocítica crónica<sup>77,78</sup>.

En cuanto a los factores que implican al virus, la dosis viral infectante junto a la severidad de aparición de la enfermedad son hechos que se relacionan con infección persistente, ya que es mas frecuente este tipo de infección en las hepatitis anictéricas<sup>136</sup>. En infecciones experimentales se ha visto que con dosis infectivas bajas se traducen en periodos de incubación largos, clínica suave y con mayor frecuencia infección persistente<sup>136,139</sup>. Hay tal correlación, que en estos estudios se ha estimado la dosis infectante en función del periodo de incubación. Por lo tanto, los portadores de HBsAg frecuentemente no tienen una historia de hepatitis aguda, mientras que en casos de recuperación de hepatitis fulminante es raro desarrollar el estado de portador.

### 6.3.- Subtipos virales

No hay evidencias de que los distintos subtipos virales tengan diferencias en cuanto a la virulencia o a la frecuencia con que se da la infección persistente<sup>228,229</sup>, aunque ocasionalmente se ha descrito asociación entre el subtipo y daño hepático o nivel de replicación<sup>230,231</sup>.

Por el contrario si existen claras diferencias en cuanto a su distribución territorial, aunque puedan existir variaciones en función del tiempo<sup>232,235</sup>. Como se vio en el punto 2 la mayoría de los subtipos poseen el determinante d o y además del w o r. El subtipo ad es común en EEUU, Norte de Europa, Asia y Oceanía, y casi es exclusivo en Japón, mientras que el ay es muy frecuente en Africa y Australia, aunque también se encuentra en la India y países Mediterráneos<sup>225,226</sup>. En nuestro país se da una situación intermedia entre lo que ocurre en el Norte-Centro de Europa y en Africa, ya que coexisten los subtipos ad y ay. Así en base a datos encontrados en la literatura<sup>232,233</sup>, y fundamentalmente a los de un estudio de reciente publicación del Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda<sup>227</sup>, podemos esperar las prevalencias en distintas provincias españolas que se expresan en la tabla VI.

Lugar	Subtipo	n°	%	ADVP	
				n°	%
Madrid	ad	30	55	9	19
	ay	25	45	39	81
Asturias	ad	16	50	9	17
	ay	16	50	43	83
Zaragoza	ad	12	37	3	13
	ay	29	63	21	87
Málaga	ad	18	38	6	23
	ay	29	62	20	77
Barcelona	ad	33	55	5	21
	ay	27	45	19	79
Valladolid	ad	15	63	-	-
	ay	9	37	-	-
Navarra	ad	2	8	-	-
	ay	24	92	-	-
Sevilla	ad	25	54	-	-
	ay	21	46	-	-
Total	ad	151	47	32	18
	ay	171	53	142	82

Tabla VI. Distribución de subtipos en España (Datos tomados de la referencia 227).

Por lo tanto la distribución de los subtipos ad y ay en la mayor parte del país se aproxima al 50%, mientras que en ADVP hay un predominio claro del subtipo ay. También se encuentra en este trabajo un predominio del subtipo ad en pacientes HbeAg aunque sin alcanzar significación estadística.

En cuanto a los determinantes w y r, el primero predomina en Europa, EEUU, Africa, India, Australia y Oceanía, y el segundo en Japón, China y SE Asiático<sup>234</sup>. En definitiva los subtipos adw, ady y adr son frecuentes y de distribución mundial, mientras que el ayr está limitado a ciertas poblaciones de Oceanía. Esta distribución geográfica probablemente refleje la localización en

función del origen y la emigración de poblaciones infectadas.

Respecto a la distribución de subtipos en miembros de una misma unidad familiar, el único trabajo que hemos encontrado es de difícil adquisición ya que ha sido realizado y publicado en China, y reporta una coincidencia en el subtipo en el 72.2% de los casos estudiados<sup>254</sup>.

## 7. DIFUSION INTRAFAMILIAR

En un principio se pensó que la transmisión del virus se realizaba exclusivamente por exposición parenteral. Posteriormente se vería su importancia como enfermedad de transmisión sexual<sup>40</sup> y Krugman<sup>15</sup> en 1967 demuestra la transmisión no parenteral al estudiar una población de retrasados mentales. Esta forma de transmisión incluiría los contactos personales prolongados, la inoculación parenteral inaparente, los contactos sexuales y la transmisión vertical, que es fundamentalmente perinatal. Globalmente las vías de difusión intrafamiliar se pueden clasificar en horizontal y vertical. La importancia de ambos mecanismos varía en función del ámbito geográfico, ya que en ciertas regiones de Africa la transmisión horizontal temprana es la mas importante<sup>191-193</sup>, mientras que en el SE Asiático predomina la vía vertical<sup>194,195</sup>. En nuestro país Bruguera<sup>236</sup> estima que la carga de la transmisión vertical es del 20% en base a los argumentos expresados en la tabla VII. Esta cifra la corrobora con una prevalencia del 0.2% de HbsAg+ que encuentra en niños de 6-7 años respecto a un total del 1% de HbsAg+ en un estudio en población general de Cataluña. Este autor concluye que la

transmisión horizontal del VHB es muy poco frecuente en la primera infancia, abogando por campañas de inmunización universal en adolescentes.

Nacimientos por año 400.000	Prevalencia HbsAg en gestantes 1%	
n°de gestantes HbsAg+ 4.000		
Gestantes HbeAg+ (6%) 240	Gestantes HbeAc+ 3.760	
90%	Riesgo infección neonatal	20%
216	Neonatos infectados	752
90%	Evolución a crónica	70%
194	Portadores crónicos	526
<b>Total de Portadores Crónicos 720=0.18% nacimientos</b>		

Tabla VII. Estimación de la importancia de la transmisión vertical del VHB. (Tomado de la referencia 236).

En múltiples estudios ha quedado patente que la prevalencia de infección por VHB es mas elevada entre familiares de portadores de HbsAg que en la población general<sup>151-179</sup>. De hecho según la clasificación del CDC en razón de la prevalencia de marcadores del virus quedan incluidos como población de alto riesgo<sup>190</sup>. En la tabla VIII se reflejan los datos de los estudios mas relevantes realizados dentro de España y en la tabla IX los de fuera de nuestro país. En la gran mayoría de ellos se obtiene una tasa de portadores (0-33%) y de marcadores de infección (18-74%) superior a la de población normal. La gran dispersión de valores es debido a que la infecciosidad del VHB depende de muchos factores, como se verá mas adelante.



En nuestro país destaca el estudio de Genesca et al<sup>174</sup> que estudiando 358 contactos de 153 casos índice (CI) obtienen una tasa de nuevos portadores del 7,2% y global del 26,8%. Mas recientemente Porres et al<sup>184</sup> estudian 848 contactos de 285 CI obteniendo una tasa global del 33,5%. Fuera de nuestro país el estudio mas numeroso es el de Smuzness<sup>156</sup> en EEUU, que con 268 CI y 1290 contactos obtiene un 6,6% de HBsAg+ y un 26% con algún marcador.

AUTOR	RE-GION	AÑO	Nº DE CI	Nº DE FAM	% DE HBsAg +	% DE HbcAc + y/o HBsAc +	% TO-TAL	REF
Peña	Cat	1984	33	96	-	-	44,7	173
Vélez	Nav	1987	58	166	5	28	33	175
Gonzalez	Lev	1988	126	499	5,8	27,2	33	176
Porres	CAM	1989	285	848	7,2	33,5	40,7	184
Genescá	Cat	1985	153	358	7,2	20,8	28	174
Rota	CAM	1990	248	459	12,4	46,4	58,8	180
Delgado-I	CAM	1991	60	111	12,6	19,8	32,5	181
Bruguera	Cat	1980	54	178	15,7	23,5	39,2	170
Arroba	CAM	1983	23	73	17,4	34,2	51,6	171
Aristegui	PV	1988	50	143	21	32	53	177
García	Arag	1983	11	37	32,4	19	51,4	172

Tabla VIII. Principales estudios españoles sobre la difusión intrafamiliar del VHB (ordenados de menor a mayor prevalencia de HbsAg+). (Cat=Cataluña, Nav=Navarra, Lev=Levante, CAM=MADrid, PV=País Vasco, Arag=Aragón)

AUTOR	PAIS	AÑO	Nº DE CI	Nº DE FAM	% DE HBSAg +	% DE HBCAc + y/o HBSAc +	% TO-TAL	REF
Singleton	EEUU	1973	12	28	0	18	18	151
Wang	Chin	1993	-	586	3,7	27,6	31,3	254
Irwin	EEUU	1974	17	52	3,8	23	27	155
Koff	EEUU	1977	42	98	5	16	21	160
Heathcote	GB	1974	29	54	5,5	26	31,5	152
Peters	EEUU	1976	33	189	6	16	22	159
Perrillo	EEUU	1979	74	188	6,3	19,6	25,9	162
Smuzness	EEUU	1975	268	1290	6,6	20	26,6	156
Bernier	EEUU	1986	157	422	8,8	20	28,8	166
Hess	Alem	1979	34	67	9	19	28	164
Helawell	GB	1975	40	93	10	16	26	157
Andreani	Fr	1986	54	86	10	37	47	168
Berris	Can	1973	46	139	13	-	-	154
Hadziy.	Gr	1975	156	476	13,6	57,4	71	158
Kim	Cor	1993	51	137	14,1	-	-	255
Ricci	It	1973	53	189	14,4	-	-	152
Eliakim	Isr	1978	44	76	18	44	62	163
Coursaget	Tun	1994	46	94	20,2	40,2	60,4	256
Maggiore	It	1985	35	101	25	29	54	167
Tong	EEUU	1979	39	255	28	46	74	161
Lok	Chin	1984	163	490	28	44	72	169
Pastore	It	1981	28	157	33	20	53	165

Tabla IX. Principales estudios de fuera de España sobre la difusión intrafamiliar del VHB (ordenados de menor a mayor prevalencia de HbsAg+; EEUU=Estados Unidos, Chin=China, GB=Gran Bretaña, Alem=Alemania, Fr=Francia, Can=Canadá, Gr=Grecia, It=Italia, Isr=Israel, Cor=Corea y Tun=Túnez).

Hay distintos factores que intervienen en la difusión intrafamiliar del VHB. Las posibilidades de contagio varían en

función del tipo de infección, siendo mayor el riesgo en infecciones de alto nivel de replicación<sup>170,178,179,185</sup> con presencia de HBeAg, aunque en otros estudios no se han encontrado diferencias significativas<sup>154,166,168,176</sup>. Este hecho se puede explicar porque estos estudios suelen ser puntuales, y en ellos se desconoce el tiempo de duración de la antigenemia en el portador y del momento en que se produjo el contagio del familiar. Muchos de los contagios se pudieron producir cuando el CI presentaba HBeAg. En estudios dinámicos con seguimiento de los contactos se suele encontrar una relación directa entre la tasa de infección con la presencia de HBeAg, DNA polimerasa o DNA viral, todos ellos indicadores de replicación viral<sup>184</sup>. También influye que la infección sea aguda o crónica, ya que en este último caso las posibilidades de contacto con el virus aumentan, habiéndose estimado que el porcentaje de individuos infectados se incrementa proporcionalmente al tiempo de convivencia con el portador crónico<sup>176,185</sup>. Bruguera obtiene una mayor seroprevalencia en familiares de portadores con hepatitis crónica o aguda frente a portadores asintomáticos<sup>179</sup>. Además hay otros factores inherentes al propio caso índice, como son la edad, el sexo y la situación dentro de la familia, pues van a influir sobre el tipo de contacto y sobre el número de individuos susceptibles de contagio. Así por ejemplo Bernier et al obtienen una asociación estadísticamente significativa entre mayor seroprevalencia en cónyuges, no blancos, mayor edad, con menor nivel de educación y siendo miembro de una familia reducida<sup>166</sup>.

Otro patrón característico de la mayoría de los estudios realizados es la alta tasa de agregación familiar del VHB, siendo

de las pocas enfermedades infecciosas que la presentan tan acusadamente. Este hecho ha llevado a postular la existencia de factores genéticos que lo determinen<sup>150,156,176,186</sup>, y se ha intentado asociar con distintos HLA<sup>206</sup> (Ver Epidemiología). En la actualidad se piensa que puede estar mediado por alguna herencia poligénica aún no identificada.

En cuanto al sexo podemos decir que la capacidad de inmunorrespuesta es mayor en el sexo femenino, por lo que es más frecuente el estado de portador en varones<sup>205</sup>.

Así pues, hay dos vías claramente establecidas de difusión intrafamiliar del VHB, que son la vía vertical (madre-hijo) y la sexual (cónyuges). Estas vías pueden explicar el mayor porcentaje de marcadores que se suelen obtener al estudiar a estos miembros de la familia. En algunos estudios, como el de Genescá et al, se obtienen diferencias significativas en función del sexo, presentando en mayor proporción marcadores los esposos de portadoras que las esposas de portadores<sup>174</sup>. Este hecho se puede explicar por un mayor número de contactos del varón con sangre de la esposa portadora, y en consecuencia con partículas infecciosas debido a la menstruación y a erosiones vaginales<sup>200,201</sup>. En cambio el semen, aunque pueda contener partículas de Dane<sup>202,204</sup>, es más frecuente que contenga partículas subvirales no infecciosas, que pueden actuar tras repetidas inoculaciones como una vacuna natural. De ahí que en este estudio se encuentre un patrón de inmunización primaria (anti-HBs aislado) en el 26% de las esposas de portadores frente a un 5% de los esposos de portadoras ( $p < 0,05$ ).

En cuanto a la difusión a otros miembros de la unidad

familiar, aunque no esté totalmente aclarado, se piensa que un mecanismo pueden ser las inoculaciones parenterales inaparentes, principalmente debidas al uso compartido de útiles de aseo<sup>179</sup>. En el estudio de Bernier et al<sup>166</sup> por el contrario, no son capaces de implicar el uso de cepillos de dientes o de maquinillas de afeitar, pero sí el compartir ropa de baño con el CI, o que éste se mordiera las uñas.

Pero aunque el VHB haya sido detectado en distintas secreciones corporales<sup>196, 200-204</sup>, posiblemente sea la saliva el vehículo mas involucrado en este tipo de transmisión. Existen algunos trabajos en la literatura que lo sugieren, como el de Leichtner et al<sup>185</sup>, en el cual en una familia con gran número de portadores detectan HBsAg en el chicle de 2 de 3 de los niños. Apuntan que el intercambio del chicle entre los niños ha podido vehiculizar la transmisión del VHB. Además se sabe que la saliva de portadores crónicos contiene intermitentemente HBsAg, independientemente de la existencia de sangre oculta<sup>196</sup>, y se ha demostrado su transmisión en infecciones experimentales con primates<sup>197, 198</sup>. Se ha sugerido que en esta transmisión oral-oral, además de útiles de aseo y saliva pueden estar involucrados otros objetos como juguetes<sup>185</sup> o incluso superficies ambientales<sup>199</sup>.

## MATERIAL Y METODOS

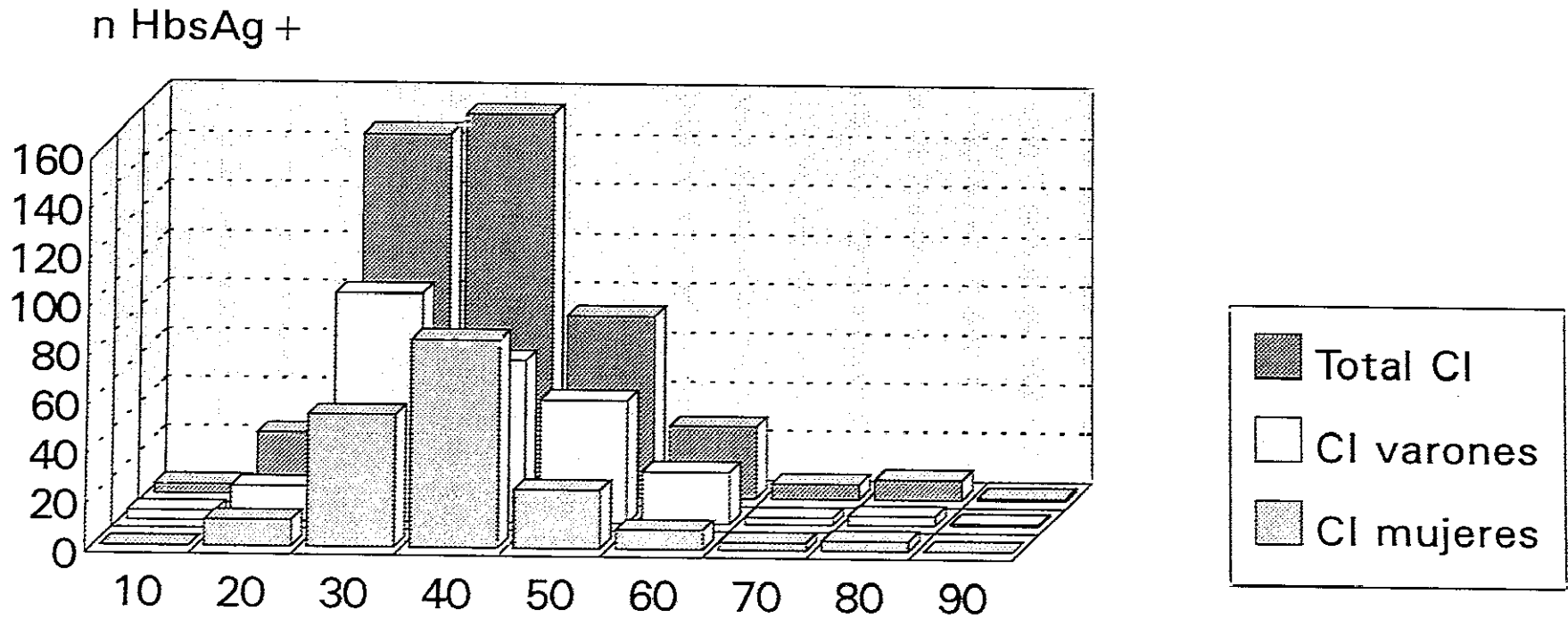
### 1.- Pacientes

Hemos estudiado un total de 449 CI (casos índice) generados a partir de 42 hepatitis agudas (22 casos en ADVP) y de 407 portadores crónicos (PC) del virus (24 de los cuales eran ADVP, 98 detectados en el estudio serológico de la gestación, 68 por estudios de donación de sangre, 160 por estudios diagnósticos diagnósticos y 57 por otras causas). Los pacientes residían en el Area Sanitaria Fuenlabrada-Leganés (Madrid) y fueron detectados durante los años 1989-1994. Se consideraron PC aquellos pacientes en los cuales persistía el HbsAg por mas de 20 semanas.

La edad media de los CI fue de 32.7 años (desviación típica 12.4, rango 4-89) siendo 256 (57%) varones y 193 (43%) mujeres. 24 eran ADVP. La estratificación por edad y sexo presentó el patrón de distribución representado en la figura 3. A partir de estos CI se estudiaron 1475 familiares o conviviente con la siguiente relación familiar: 231 eran padres, 251 hermanos, 540 hijos, 316 cónyuges y los 137 restantes convivientes o familiares de segundo grado del CI. Los datos sobre edad y sexo de los familiares se expondrán en el apartado de Resultados (tabla X).

La tasa de cronicidad se definió como el número de individuos que mantienen el HbsAg (PC) respecto al total que sufre la infección ( $TC = \frac{n^{\circ} \text{ individuos HbsAg+}}{n^{\circ} \text{ de individuos HbcAc+}}$ ).

# Estratificación por edad y sexo de los Casos Índice



Total CI	4	25	147	155	74	29	6	8	1
CI varones	4	14	93	66	50	21	3	4	1
CI mujeres	0	11	54	85	24	8	3	4	0

Edad

## 2.- Ensayos serológicos

Los sueros se recogieron y procesaron por la metodología convencional congelándose posteriormente a  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Los marcadores serológicos se realizaron mediante enzimoimmunoensayo de micropartículas (MEIA, IMX, Abbott) siguiendo las instrucciones del fabricante y fueron los siguientes: HbsAg, HbcAc, HbsAc, HbeAg, HbeAc e IgM-HbcAc.

La detección de anticuerpos frente al virus delta se realizó mediante ELISA IgG (Sorin) en microplaca.

En los pacientes que apareció el perfil de HbcAc aislado se confirmó dicha reactividad mediante otro método inmunoenzimático automatizado para HbcAc (ES700, Boehringer Mannheim), aplicándoles posteriormente un ensayo de confirmación de HbcAc mediante agentes reductores. Este se llevó a cabo con metabisulfito sódico (Sigma) 1 M (MBS), añadiendo  $5\ \mu\text{l}$  a  $250\ \mu\text{l}$  de suero con posterior ensayo de HbcAc (ES700, Boehringer Mannheim). Los criterios de positividad mediante este ensayo fueron los mismos que en el ensayo convencional. Como es un ensayo competitivo se consideran positivos las reactividades con ratio (absorbancia del suero/absorbancia del punto de corte) menor a 1.

Este mismo método se aplicó a 80 sueros HbcAc+ (30 pertenecientes a PC HbsAg+ HbcAc+ y otros 50 de pacientes con hepatitis B pasada HbsAg- HbcAc+ HbsAc+) así como a 30 HbcAc- conocidos, con el fin de evaluar la sensibilidad y especificidad



del método. Así mismo el ensayo HbcAc-MBS se aplicó posteriormente a 30 sueros obtenidos en la rutina hospitalaria pertenecientes a pacientes con alta probabilidad de presentar un resultado falsamente positivo (todos ellos menores de 25 años con HbcAc+ positivo como único marcador de débil o media reactividad: ratio 0.5-1 ).

### 3.- Subtipado del VHB

Se realizó por un método ELISA no comercializado utilizando anticuerpos monoclonales suministrados por la Dra. Sheila Grace (Murex Diagnostics, Dartford).

El ensayo estaba basado en la comparación de la reactividad de los sueros frente a un anticuerpo monoclonal (MAC7) que reacciona frente a ambos subtipos (ad, ay), frente a otro (MAC5) de alta afinidad frente al subtipo ay, ambos conjugados con peroxidasa para realizar un ensayo ELISA. Para que los resultados de absorbancia frente a ambos monoclonales fueran comparables, hubo que practicar previamente diluciones en los sueros de modo que en el ensayo convencional de detección de HbsAg de Murex presentaran una absorbancia a una longitud de onda de 450 nm entre 1 y 2  $\pm$  0.5, de manera que la diferencia de afinidad por los distintos anticuerpos monoclonales se pusiera de manifiesto. El ensayo consistió en lo siguiente:

75  $\mu$ l de sueros o controles prediluidos se añadieron a 25  $\mu$ l de diluyente en dos placas microtiter añadiendo en una de ellas 50  $\mu$ l de MAC5 y en la otra de MAC7, con posterior incubación de 90 minutos en cámara húmeda. El ensayo se continúa igual que el ensayo comercial de detección de HbsAg (lavar 5

veces, añadir 100  $\mu$ l de sustrato e incubar 30 minutos, parar con 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico 1 M y leer a 450 nm). Los sueros con ratio MAC5/MAC7 superior a 3 se consideraron del subtipo ad e inferior a 3 del ay. Todos los sueros de con ratio entre 1.5 y 3.5 fueron ensayados de nuevo para confirmar resultados. Los controles utilizados (control positivo comercial de Murex, QC-1129 para el subtipo ad y QC-1123 para el subtipo ay) también fueron suministrados por la Dra. Sheila Grace (Murex, Dartford). También se utilizaron dos sueros previamente tipados en el Centro Nacional de Microbiología de Majadahonda (CCCNM-ad y CCCNm-ay).

#### 4.- PCR

Se realizó la detección de ADN del VHB mediante PCR utilizando un método comercial (Durviz), siguiendo las instrucciones del fabricante y tomando las precauciones habituales para realizar esta técnica. Este ensayo lleva iniciadores de la región del core, y consiste en una doble amplificación del ADN (nested PCR), con los siguientes ciclos de amplificación:

<u>nºciclos</u>	<u>°C (temperatura)</u>	<u>Tiempo</u>
1	94	4'
30	94	1'30''
	42	1'30"
	72	3'
1	72	10'

Como control positivo se utilizó en cada ensayo un suero de

un portador crónico con ADN VHB previamente detectado mediante un ensayo de hibridación (Digene DNA HBV, Murex).

#### 5.- Vacunación

Se utilizó la vacuna recombinante Engerix (SKF) siguiendo la pauta de vacunación 0,1,6 (tres dosis en un periodo de seis meses) considerando respondedores a la vacuna a aquellos que presentaron niveles de HbsAc superiores a 10 U.I./l testada al mes de recibir la última dosis. Los individuos con débil respuesta (<50 U.I./l) o nula recibieron una cuarta dosis. Los individuos que no acudiesen a recibir alguna dosis de vacuna o a algún control serológico eran avisados por teléfono o carta con el fin de que lo hicieran. Todas las vacunas fueron suministradas por la Consejería de Salud de la CAM.

Aquellos individuos que presentaron HbcAc aislado recibieron una primera dosis de vacuna, analizando los niveles de HbsAc un mes mas tarde, considerando que se trataba de un refuerzo anamnésico si los niveles de HbsAc eran superiores a 300 U.I/l, y en caso contrario se completaba la vacunación hasta recibir las tres dosis de vacuna.

#### 6.- Estudio estadístico

Se creó una base de datos con 166 variables en el programa estadístico Sigma (Horus), mediante el cual se realizó todo el estudio estadístico. Debido a la enorme cantidad de datos que se

pueden extraer de dicha base de datos, hemos intentado plasmar únicamente los mas interesantes en el apartado de Resultados. Los ensayos utilizados como criterio de significación estadística han sido el test de Chi cuadrado para variables cualitativas con la corrección de Yates y la comparación de medias para variables cuantitativas con muestra homogénea. En la expresión de porcentajes con importancia también se expresa el intervalo de confianza del 95% (IC95%).

## RESULTADOS

Los resultados van a exponerse con el orden siguiente: en primer lugar los resultados del estudio epidemiológico de los CI y familiares, dividiéndolos en distintos puntos para su mejor comprensión, destacando el estudio de subtipos; a continuación los resultados analíticos de los casos con perfiles atípicos con especial atención al HbcAc aislado, con los tres métodos de estudio ensayados (respuesta a la vacuna, tratamiento con MBS y detección de ADN por PCR); y por último, los resultados del programa de vacunación por sus posibles aplicaciones prácticas.

## A. Estudio epidemiológico de la transmisión intrafamiliar

### 1.- Casos índice (CI).

Los marcadores serológicos de los CI fueron los siguientes:

- HbsAg+ HbcAc+ HbcAcIgM- (ó +-): 407 portadores crónicos del virus de los cuales 24 eran ADVP, con los siguientes marcadores respecto al antígeno e:

HbeAg+ HbeAc-: 37 (9.0%)

HbeAg- HbeAc+: 361 (88.7%)

HbeAg- HbeAc-: 9 (2.2%)

- HbsAg+ HbcAc+ HbcAcIgM+: 42 casos que presentaban datos clínicos y analíticos compatibles con hepatitis B agudas (27 HbeAg + y 15 HbeAc+) de los cuales 22 eran ADVP. 8 pacientes (19%) desarrollaron el estado de PC (4 de ellos ADVP), aunque el bajo número de casos estudiado no permite sacar conclusiones.

La estratificación por edad y sexo se expuso en el apartado de Pacientes (figura 3).

### 2.- Estudio de familiares

La media de familiares estudiados a partir de cada CI fue de 3.29 (desviación típica 1.8, rango 1-21) siendo en total 1475. El resumen de los marcadores serológicos obtenidos se refleja en la tabla X y se esquematiza en la figura 4.

Parentesco	N°	$\bar{E}^1$	Rango	HbsAg+ (%)	HbcAc+ <sup>2</sup> (%)	HbcAc- (%)
Padres	231	51	27-81	23 (9.9)	126 (54.5)	105 (45.5)
Cónyuges	316	35	18-80	9 (2.8)	110 (34.8)	206 (65.2)
Hijos	540	12	0-48	27 (5.0)	83 (15.4)	457 (84.6)
Hermanos	251	20	2-49	42 (16.7)	116 (46.4)	135 (53.6)
Otros <sup>3</sup>	137	24	0-60	2 (1.4)	18 (13.1)	119 (86.9)
<b>TOTAL</b>	<b>1475</b>	<b>26</b>	<b>0-81</b>	<b>103 (7.0)</b>	<b>453 (30.7)</b>	<b>1022 (69.3)</b>

Tabla X . Resumen de los marcadores frente al VHB de los familiares estudiados.

$\bar{E}^1$  = edad media

HbcAc+<sup>2</sup> = corresponde a todos los que presenten algún marcador positivo frente al virus incluidos los HbsAg+.

Otros<sup>3</sup> = abuelos, nietos, cuñados, yernos, sobrinos y otros convivientes.

Los individuos HbsAg+ son los que mayor interés presentan ya que son el reservorio del virus y a partir de ellos se disemina el virus, por lo que los datos sobre edad de los familiares HbsAg+ encontrados se muestra en la tabla XI.

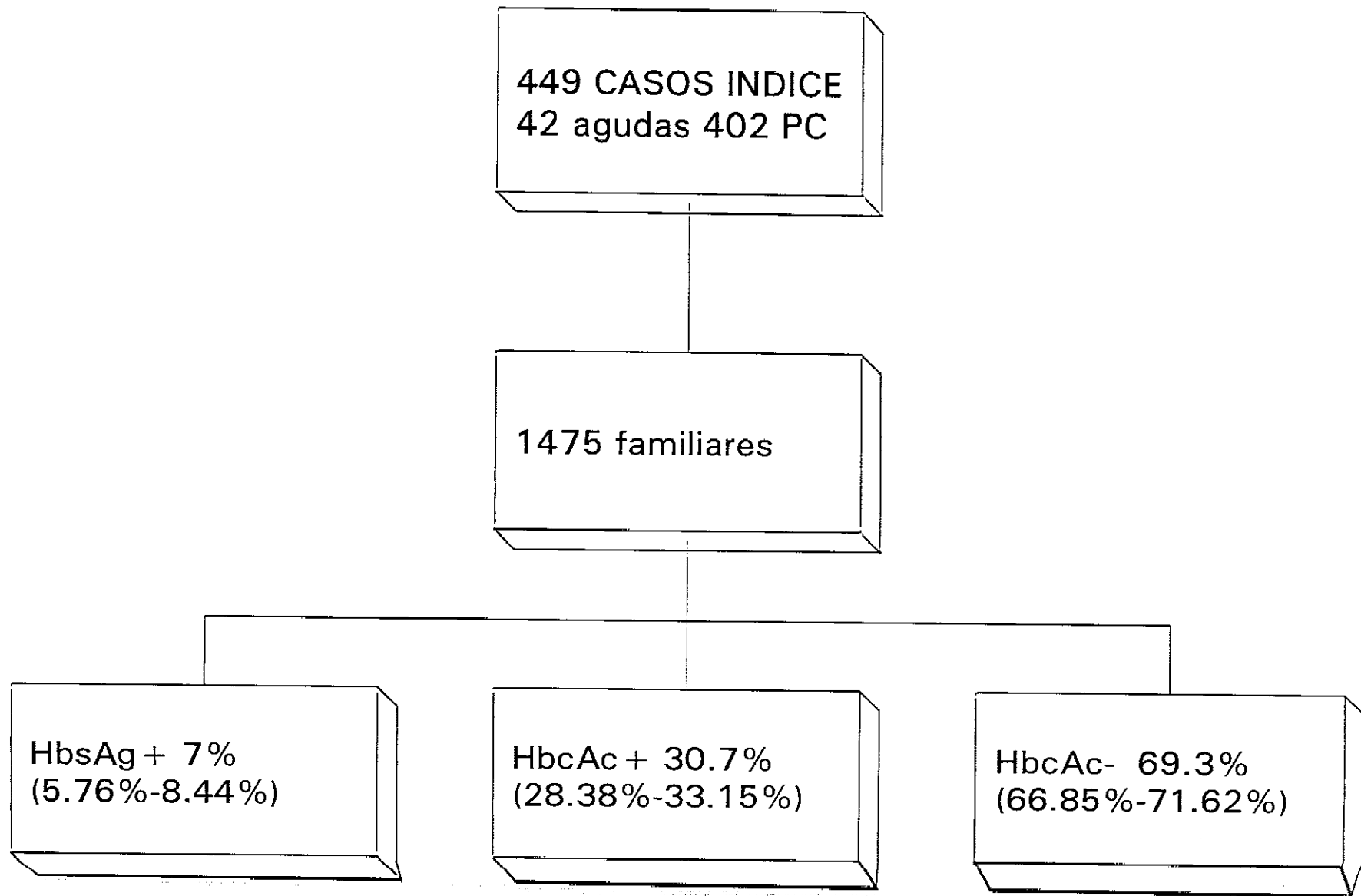
Parentesco	N°	$\bar{E}^1$	Rango
Padres	23	52	32-71
Cónyuges	9	35	29-39
Hijos	27	16	2-34
Hermanos	42	25	12-37

Tabla XI. Datos sobre la edad de los nuevos PC encontrados.

Para llevar a cabo un análisis mas adecuado de los resultados a continuación se expondrán los marcadores de los distintos grupos de familiares, siendo en ocasiones interesante desglosar estos grupos en función del sexo del CI que ha originado el estudio.

# Figura 4. Resumen del estudio de familiares realizados

(CI95%: Intervalo de confianza del 95%)





## 2.1.- Marcadores de los Padres

De los 231 progenitores estudiados se obtuvo un 9.9% de HbsAg+ y un 54.5% de HbcAc+, con una tasa de cronicidad del 18.25%. Los resultados en función del sexo del progenitor y del CI son los de la tabla XII, y que se respresentan gráficamente en la figura 5.

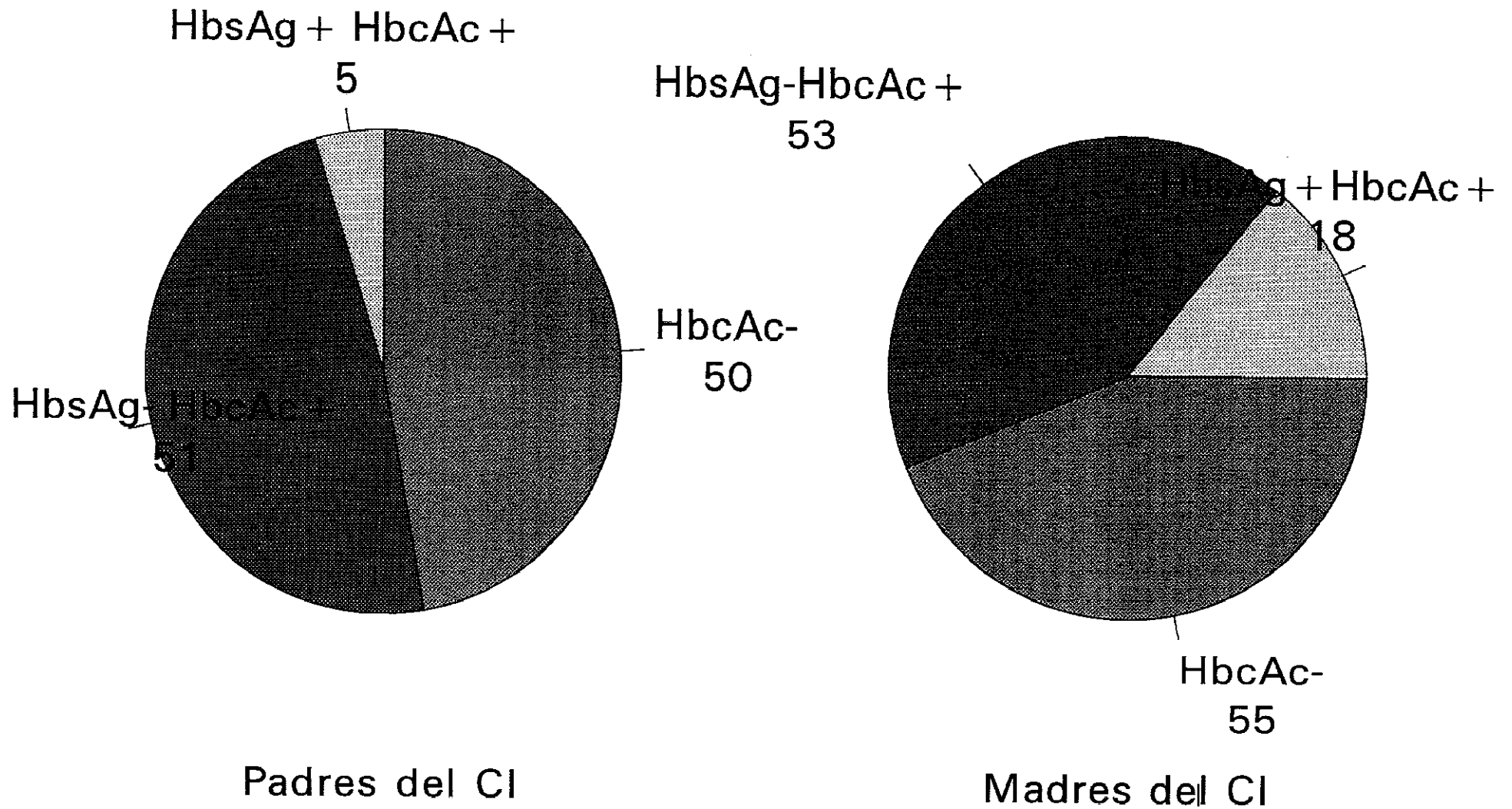
REL. FAMILIAR	n°	HbcAc-	HbsAg+ HbcAc+		HbsAg- HbcAc+		TOTAL VHB+
			HbeAg+ HbeAc-	HbeAg- HbeAc+	HbsAc- HbsAc+		
PADRE (♂)	106	50	1	4	16	35	56
MADRE (♀)	125	55	3	15	13	40	70

Tabla XII. Marcadores frente al VHB de los progenitores del CI

Comparando los resultados se observa una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) entre el número de madres portadoras crónicas HbsAg+ (14.4%) y el de los padres (4.7%) de los CI, aunque no hay diferencias en cuanto al global de marcadores frente al virus. Por consiguiente la TC de las madres resultó ser significativamente mayor ( 25.7% frente a un 8.9%).

Es interesante también la selección de los progenitores de los CI que no presentaban aparentemente un factor de riesgo de infección extrafamiliar como son los UDVP, en la cual se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla XIII.

# Figura 5. Marcadores de los Padres y Madres del CI



REL. FAMILIAR	n°	HbcAc-	HbsAg+ HbcAc+		HbsAg- HbcAc+		TOTAL VHB+
			HbeAg+ HbeAc-	HbeAg- HbeAc+	HbsAc- HbsAc+	HbsAc+	
PADRE (♂)	74	31	1	4	10	28	43
MADRE (♀)	87	30	2	15	9	31	57

Tabla XIII. Marcadores frente al VHB de los progenitores de CI excluyendo UDVP.

Los resultados resultan mas espectaculares en el caso de las madres ya que un 19.5% resultan ser HbsAg+, con tasas de cronicidad cercanas al 30%.

También resulta interesante para ver la incidencia de la transmisión sexual en función del sexo el estudiar los marcadores de la pareja de los PC encontrados en este grupo (Padres y Madres del CI), ya que probablemente sea el grupo en el que mas prolongado ha sido el contacto debido a su mayor edad. Los resultados fueron los mostrados en la tabla XIV.

MARCADORES	CONYUGES DE MADRE HBSAG+	CONYUGES DE PADRE HBSAG+
HbsAg +	1 (6.66%)	1 (20%)
HbcAc +	10 (66.66%)	4 (80%)
HbcAc -	4 (26.66%)	-
No estudiados	2	-

Tabla XIV. Marcadores del cónyuge de las madres o padres HbsAg+ encontrados.

El bajo número de casos no permite realizar estudios comparativos aunque si se encuentran mayores tasas de infección en mujeres.

## 2.2.- Marcadores de los cónyuges

Se estudiaron 316 cónyuges del CI con un resultado global del 2.8% de HbsAg+ y 34.8% de HbcAc+ (Tasa de cronicidad 8.2%). La diferenciación en cuanto al sexo arroja los resultados expuestos en la tabla XV y representados en la figura 6.

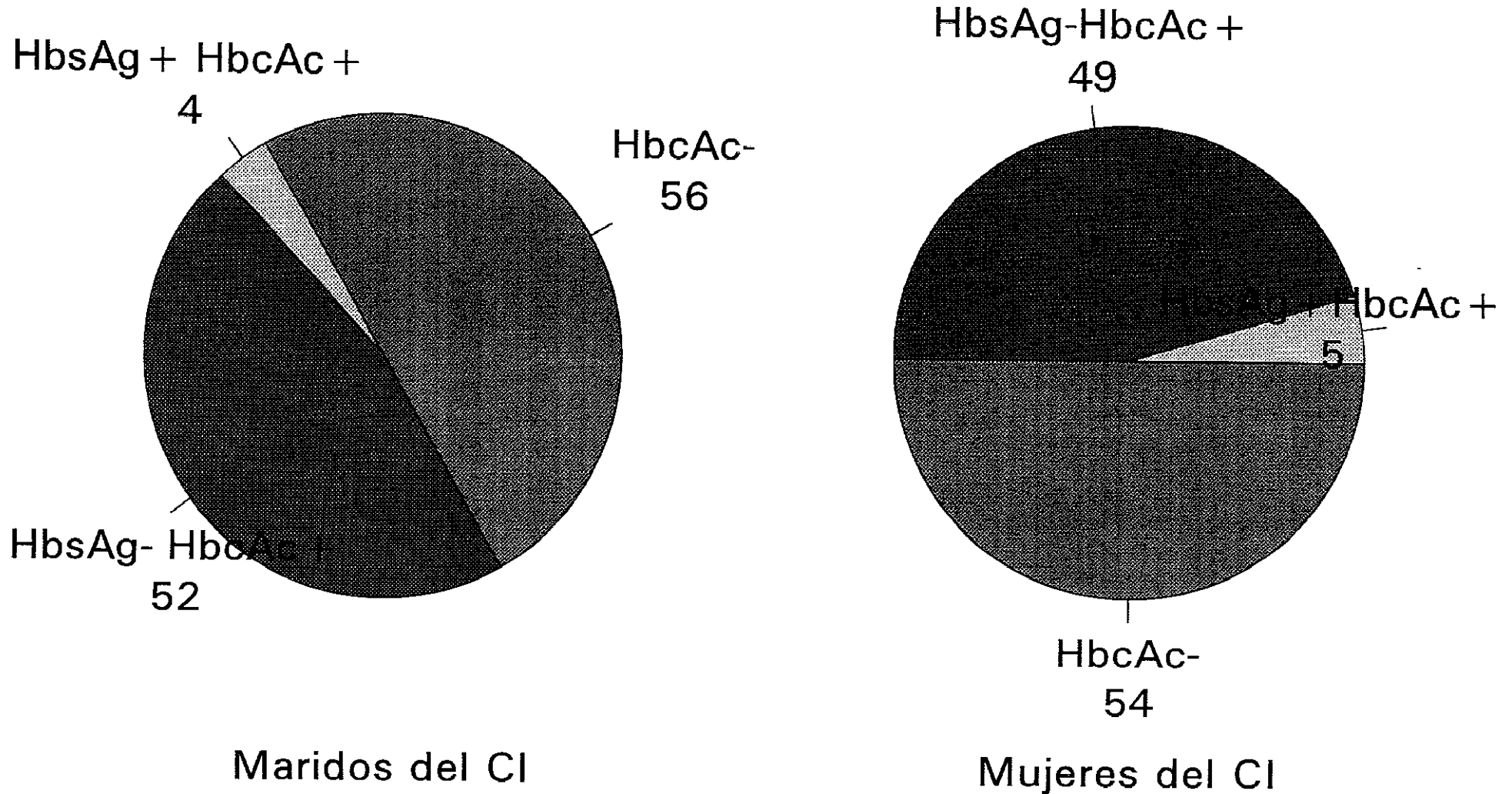
CON- YU- GES	n°	HbcAc-	HbsAg+ HbcAc+		HbsAg- HbcAc+		TO- TAL VHB+
			HbeAg+ HbeAc-	HbeAg- HbeAc+	HbsAc- HbsAc+	HbsAc+	
♂	148	92	0	4	9	43	56
♀	168	114	0	5	5	44	54

Tabla XV. Marcadores de los cónyuges del CI.

El porcentaje de portadores crónicos en maridos y mujeres del CI (2.7% vs 2.9%), así como los globales de marcadores frente al virus (37,8% vs 32,1%) son similares en ambos grupos.

# Figura 6. Marcadores de los Conyuges del CI

---



## 2.3.- Marcadores de los hijos

La distribución por sexos y en función de si el CI era el padre o la madre se expone en la tabla XVI y en las figuras 7.1 y 7.2.

REL. FAMILIAR	n°	HbcAc-	HbsAg+ HbcAc+		HbsAg- HbcAc+		TO-TAL VHB +
			HbeAg+ HbeAc-	HbeAg- HbeAc+	HbsAc- HbsAc+		
HIJO (♂)	287	241	6	10	3	27	46
HIJA (♀)	253	216	3	8	2	24	37
HIJOS DE CI♂ (padre)	303	274	2	2	1	24	29
HIJOS DE CI♀ (madre)	237	183	7	16	4	27	54

Tabla XVI. Marcadores de los hijos en función de su sexo y de el del CI (padre o madre).

Por lo tanto un 5.9% fueron HbsAg+ y un 15.4% HbcAc+ (TC del 32.5%), no habiendo diferencias significativas en cuanto al sexo de los hijos que presentaron marcadores frente al virus:

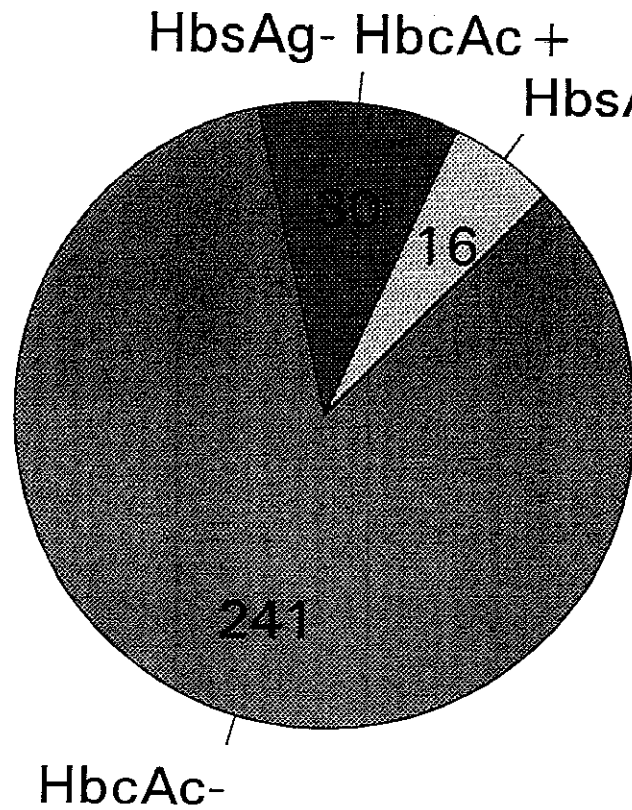
- Varones (Hijos): 16 (5.57%) HbsAg+ y 46 (16%) HbcAc+
- Mujeres (Hijas): 11 (4,34%) HbsAg+ y 37 (14,6%) HbcAc+

Pero en cambio sí hubo diferencias estadísticamente significativas respecto a los marcadores en función del sexo del CI (es decir que fuera el padre o la madre):

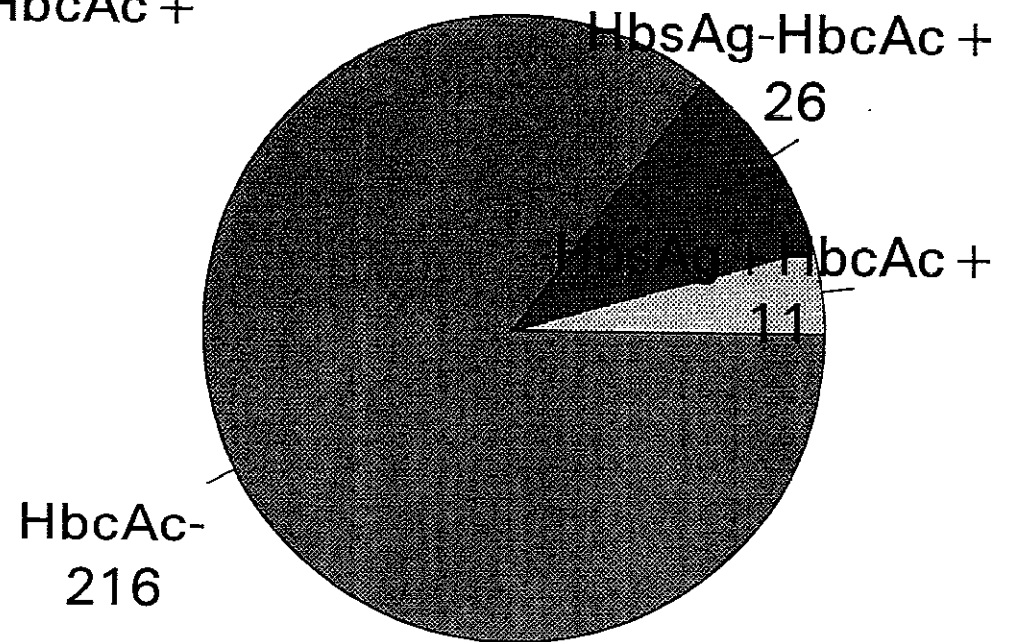
- HbsAg+: 23 (9,7%) hijos de madre HbsAg+ (CI♀, 4ª fila de la tabla) y 4 (1,3%) hijos de padre HbsAg+ (CI♂, 3ª fila de la tabla) ( $p < 0,001$ ), pudiendo adscribirse uno de estos cuatro

# Figura 7.1 Marcadores de los Hijos del CI

---



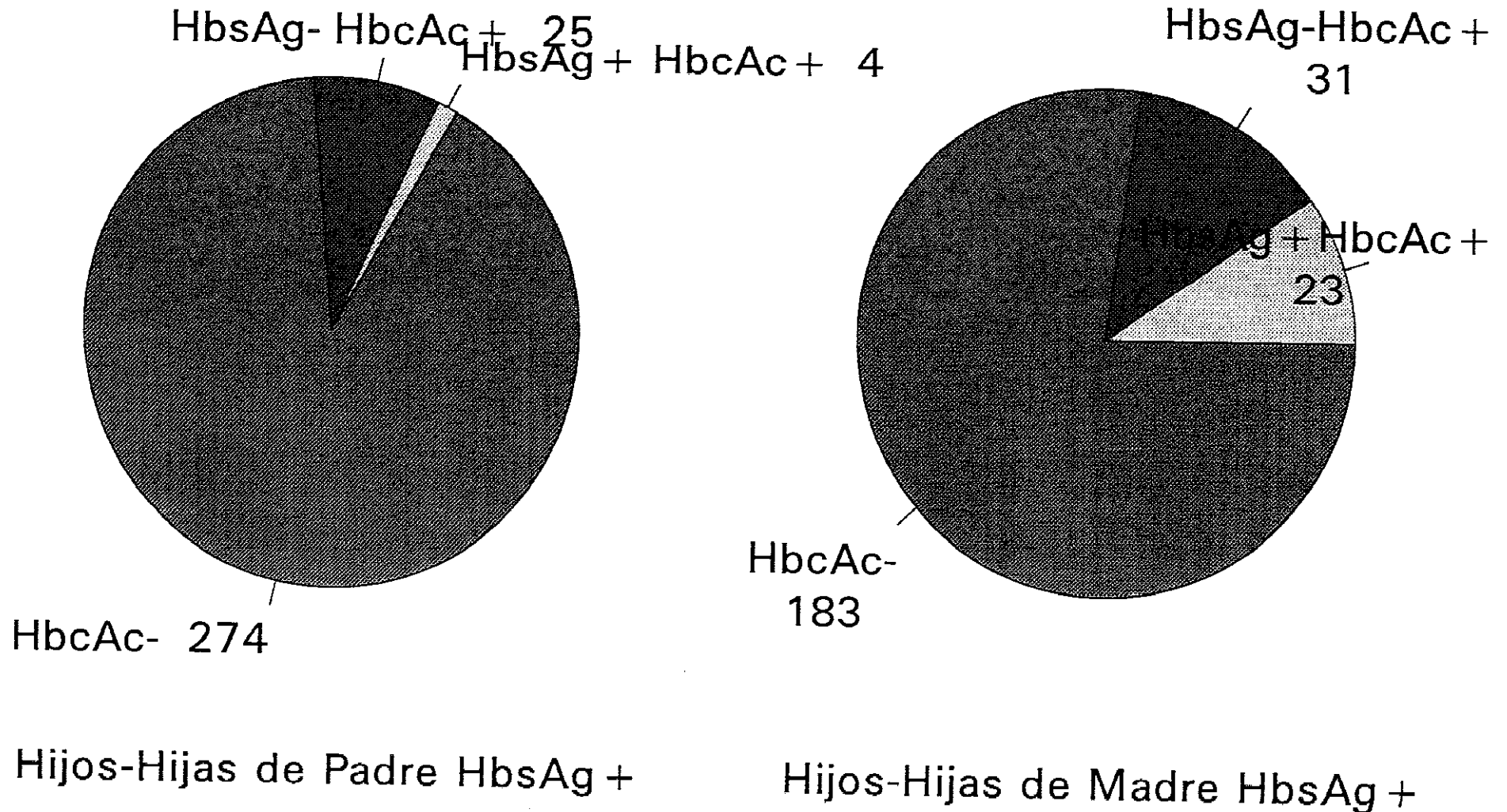
Hijos del CI



Hijas del CI

# Figura 7.2 Marcadores de los Hijos del CI

En funcion del sexo del CI





casos también al primer grupo ya que la madre era así mismo HbsAg+. En los otros tres casos de este grupo, la madre era HbsAg-, HbcAc+ y HbsAc+, es decir también había sido infectada por el virus.

- HbsAg- HbcAc+: 31 (13%) en hijos de madre HbsAg+ y 25 (8.2%) en hijos de padre HbsAg+ ( $p=0,02$ ).

### 2.3.- Marcadores de los hermanos

Este grupo fue en el que se encontraron mas PC, ya que 42 hermanos de los CI fueron HbsAg+ (16.7%). En contacto con el virus había estado un 46.4% (HbcAc+), de los cuales un 80% eran menores de 30 años, y la TC fue del 36.2%. La distribución por sexos se muestra en la tabla XVII y en la figura 8.

HER- MA- NOS	N°	HbcAc-	HbsAg+ HbcAc+		HbsAg- HbcAc+		TO- TAL VHB+
			HbeAg+ HbeAc-	HbeAg- HbeAc+	HbsAc- HbsAc+	HbsAc+	
♂	127	59	6	23	6	34	69
♀	123	76	3	10	4	30	47

Tabla XVII. Marcadores de los hermanos en función del sexo.

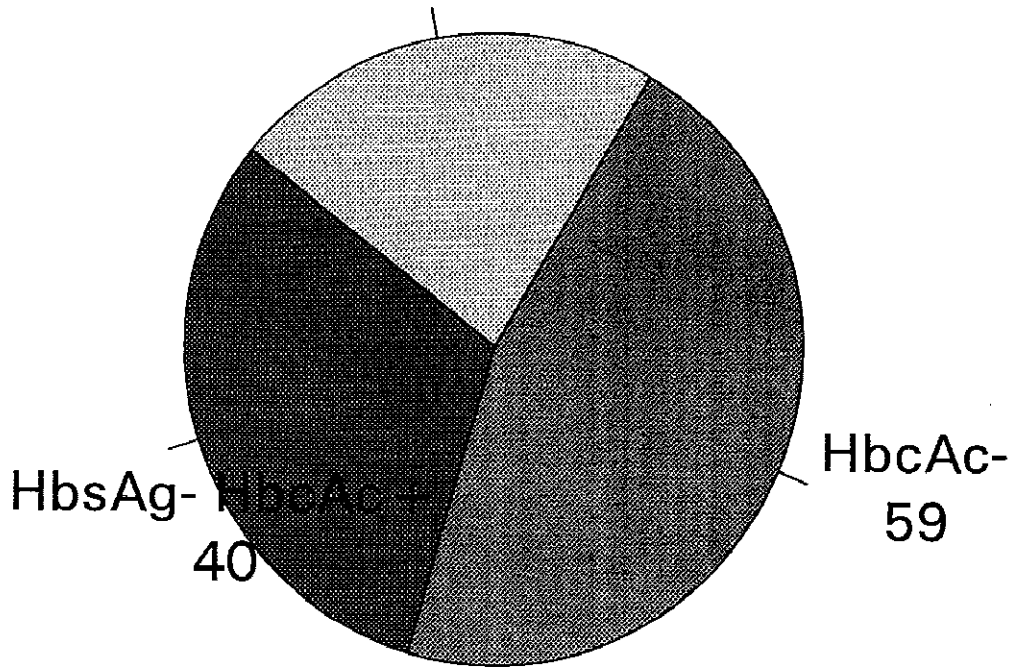
Se obtienen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al sexo de los hermanos respecto al número de portadores crónicos: 29 (22,8%) HbsAg+ hermanos (♂) vs 13 (10,5%) hermanas (♀), ( $p<0.01$ ), pero no respecto a los HbsAg- HbcAc+: 40 (31,5%) en varones y 34 (27,6%) en mujeres.

Estos datos nos hicieron profundizar en el estudio de estos 42 hermanos del CI, descubriendo que estaban ubicados en

# Figura 8. Marcadores de los Hermanos del CI

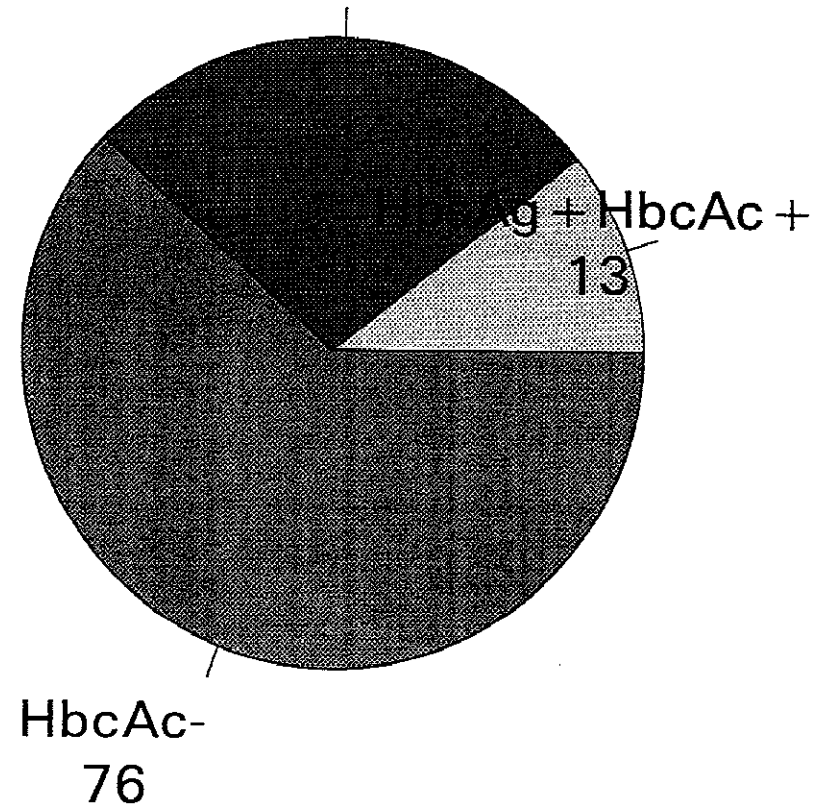
---

HbsAg + HbcAc +  
29



Hermanos del CI

HbsAg-HbcAc +  
34



Hermanas del CI

tan solo 28 familias que contaban con 38 hermanos y 28 hermanas, los cuales presentaban los siguientes resultados:

29/38 varones eran HbsAg+

13/28 mujeres eran HbsAg+

por lo que la comparación estadística ya no alcanza los límites de significación estadística.

También resultó de gran interés el estudiar los marcadores de las madres de este subgrupo de 28 familias (que a su vez es la madre del CI), lo que fue posible en 22 ocasiones con los resultados siguientes: 7 (32%) HbsAg+, 11 (50%) HBcAc+ y 4 (18%) HbcAc-.

#### 2.4.- Otros

Solo se exponen los marcadores en función de la relación con el CI (tabla XVIII).

Rel. Familiar	n°	HBcAc-	HbsAg+ HbcAc+		HbsAg- HbcAc+		TOTAL VHB+
			HbeAg+ HbeAc-	HbeAg- HbeAc+	HbsAc- HbsAc+		
ABUELOS	7	6	0	0	0	1	1
CUÑADOS	19	11	0	0	1	8	9
YER- NOS	11	10	0	0	0	1	1
NIE- TOS	24	22	0	0	0	2	2
SOBRI NOS	44	40	0	2	0	2	4
OTROS	32	31	0	0	0	1	1

Tabla XVIII. Marcadores de otros familiares o convivientes.

De estos datos únicamente merece la pena mencionar que los dos únicos familiares HbsAg+ encontrados fueron dos sobrinos que a su vez tenían una relación de primer grado con otro portador crónico, ya que en uno de ellos la madre era HbsAg+ y en el otro el padre, y que a su vez eran hermanos del CI. La TC de este grupo fue del 11.1%.

### 3.- Distribución de subtipos virales

Se realizó el subtipado del virus en 30 unidades familiares con mas de un individuo HbsAg+, con un total de 84 individuos HbsAg+ (Casos índice I al XXX) y a un panel de control (QC 1129, CCCNM-ad para el subtipo ad y QC 1123, CCCNM-ay para el subtipo ay). La relación con el CI era la siguiente: 11 hermanos, 10 hermanas, 4 padres, 5 madres, 2 maridos, 3 esposas, 11 hijos, 6 hijas y 2 sobrinos. Los resultados de las absorbancias a 450 nm de los ELISA realizados con los anticuerpos monoclonales MAC5 y MAC7 y su interpretación en función del ratio entre ambos se detallan en la tabla XXVII.

Tabla XXVII. Resultados del ensayo de subtipado.

n°	n°CI/sexo o Relación familiar	Hbe Ag	Dilución muestra 1/	A <sub>450</sub> MAC5	A <sub>450</sub> MAC7	Ratio MAC 5/7	Sub- tipo
1	CI-I/♂	-	2500	2.025	0.624	3.24	ad
2	Hermano	-	2500	3	0.4	7.5	ad
3	Hermano	-	2500	2.157	0.644	3.37	ad
4	CI-II/♂	+	15000	2.160	0.332	6.5	ad
5	Padre	+	15000	3	0.329	11.6	ad
6	CI-III/♀	-	2500	3	0.9	3.33	ad
7	Hermano	+	5000	3	0.53	5.77	ad
8	CI-IV/♂	-	1000	1.218	1.135	1.07	ay
9	Madre	-	1000	1.441	1.375	1.05	ay
10	CI-V/♂	-	100	0.635	0.412	1.54	ay
11	Padre	-	10	1.598	0.373	4.28	ad
12	Madre	-	5000	0.487	0.470	1.03	ay
13	Hermano	-	1000	0.648	0.601	1.01	ay
14	CI-VI/♀	-	2500	0.647	0.424	1.52	ay
15	Sobrino	+	10000	0.639	0.613	1.04	ay
16	Hermana	-	5000	0.629	0.537	1.17	ay
17	Hermano	+	50000	0.675	0.559	1.20	ay
18	Padre	-	2500	0.884	0.762	1.16	ay
19	Hermano	-	5000	2.358	1.969	1.19	ay
20	Sobrino	-	1000	1.228	1.151	1.07	ay
21	CI-VII/♂	-	2500	1.759	0.319	5.5	ad
22	Hijo	-	2500	1.302	0.301	4.3	ad
23	Esposa	-	1000	3	0.452	6.63	ad
24	CI-27/♀	+	5000	0.598	0.591	1.01	ay
25	Hija	+	5000	0.448	0.392	1.14	ay
26	Hija	+	5000	0.721	0.491	1.46	ay
27	Hermana	+	15000	2.030	1.212	1.67	ay

Tabla XXVII (Continuación)

n°	n°CI/sexo Relación familiar	Hbe Ag	Dilución muestra 1/	A <sub>450</sub> Monoc5	A <sub>450</sub> Monoc7	Ratio 5/7	Sub- tipo
28	CI-VIII/♀	-	2500	2.287	2.468	0.92	ay
29	Madre	-	2500	2.548	2.611	0.98	ay
30	CI-IX/♂	-	100	1.895	2.0	0.95	ay
31	Hermana	-	1000	0.512	0.538	0.95	ay
32	CI-X/♀	-	500	3	0.298	10.06	ad
33	Hermana	-	1000	2.548	0.611	4.17	ad
34	CI-XI/♂	-	1000	0.646	0.220	3.23	ad
35	Madre	-	1000	1.612	0.320	5.03	ad
36	Hermana	-	2500	2.618	0.420	6.2	ad
37	CI-XII/♂	+	25000	0.842	0.889	0.94	ay
38	Hermano	-	500	1.089	0.687	1.58	ay
39	CI-XIII/♂	-	200	1.611	1.094	1.47	ay
40	Mujer	-	200	0.686	0.340	2.01	ay
41	CI-XIV/♂	-	1000	1.218	1.135	1.07	ay
42	Hermano	-	50	0.953	0.666	1.43	ay
43	CI-XV/♀	-	1000	1.575	1.600	0.98	ay
44	Hijo	+	50000	2.249	2.204	1.02	ay
45	Hija	-	1000	1.263	1.526	0.83	ay
46	Hermana	+	50000	2.150	1.899	1.13	ay
47	CI-XVI/♂	-	100	1.250	1.296	0.96	ay
48	Esposa	-	1	0.595	0.596	0.99	ay
49	Hermano	-	2500	1.853	1.411	1.31	ay
50	CI-XVII/♂	-	2500	3.0	0.520	5.77	ad
51	Hermano	-	2500	3.0	0.551	5.44	ad
52	CI-XVIII/♀	-	2500	2.243	2.310	0.97	ay
53	Hermana	-	2500	1.159	0.713	1.62	ay
54	Marido	-	2500	1.843	2.464	0.75	ay

n°	n°CI/sexo Relación familiar	Hbe Ag	Dilución muestra 1/	A <sub>450</sub> Monoc 5	A <sub>450</sub> Monoc 7	Ratio 5/7	Sub- tipo
55	CI-XIX/♂	-	2500	3.0	0.627	4.82	ad
56	Hijo	+	15000	3.0	0.570	5.26	ad
57	CI-XX/♂	+	1000	0.837	0.237	3.67	ad
58	Hijo	+	2500	1.694	0.348	5.0	ad
59	CI-XXI/♂	-	2500	1.603	1.554	1.03	ay
60	Hijo	-	1000	2.178	2.131	1.02	ay
61	CI-XXII/♀	-	2500	1.652	1.803	0.92	ay
62	Hijo	+	25000	1.223	1.215	1.00	ay
63	Hijo	+	50000	0.583	0.685	0.85	ay
64	Marido	-	100	0.706	0.609	1.16	ay
65	CI-XXIII/♀	-	2500	1.270	1.203	1.05	ay
66	Hija	-	2500	2.390	2.682	0.89	ay
67	Hija gemela	-	2500	2.671	2.511	1.06	ay
68	CI-XXIV/♂	-	5000	1.160	0.749	1.55	ay
69	Hermana	+	25000	1.090	0.803	1.35	ay
70	Madre	+	5000	1.527	1.687	0.90	ay
71	Padre	-	25000	0.630	0.480	1.31	ay
72	CI-XXV/♀	-	500	3.0	0.579	5.18	ad
73	Hijo	-	2500	2.070	0.435	4.76	ad
74	CI-XXVI/♀	+	25000	2.170	2.170	1.29	ay
75	Hermana	+	25000	0.638	0.948	0.67	ay
76	Hija	-	2500	2.030	2.098	0.96	ay
77	Hijo	+	15000	1.868	1.539	1.21	ay
	Control-		1	0.138	0.134	-	-
	Control+		1	1.625	0.527	3.08	ad
	QC-1129		1	0.724	0.153	4.73	ad
	CCCNM-ad		2500	0.718	0.109	7.03	ad
	QC-1123		1	0.845	0.614	1.37	ay
	CCCNM-ay		5000	0.812	0.610	1.33	ay

Tabla XXVII (Continuación)

n°	n°CI/sexo Relación familiar	Hbe Ag	Dilu- ción mue- stra 1/	A <sub>450</sub> MAC5	A <sub>450</sub> MAC7	Ratio 5/7	Sub- tipo
78	CI-XXVIII/♂	-	1000	3	0.420	6.81	ad
79	Hijo	-	1000	3	0.320	9.37	ad
80	Hermana	-	2500	1.618	0.420	3.85	ad
81	CI-XXIX/♀	-	1000	3	0.435	6.89	ad
82	Hermana	-	500	3	0.278	10.78	ad
83	CI-XXX/♂	-	500	3	0.363	8.26	ad
84	Hijo	+	5000	3	0.496	6.04	ad

En resumen se puede decir que 31 PC (36.9%; IC95%:26.83-48.19) se adscribieron al subtipo *ad* y 53 (63.10%; IC95%:51.81-73.17) al subtipo *ay*, habiendo coincidencia en el subtipo en 29 de las 30 familias estudiadas (13 del subtipo *ad* y 16 del *ay*). Solamente en la familia V se dieron ambos subtipos.

La presencia de HBeAg se correlacionó, como era de esperar, con el nivel de reactividad de los sueros, pero presentó una distribución similar en ambos grupos: 7/31(22.58%) en el subtipo *ad* y 16/53 (30.18%) en el *ay*.

4.- Comparación de los marcadores de familiares de casos de hepatitis aguda con los de portadores crónicos.

La distribución de familiares con algún marcador frente al virus en ambas situaciones se muestra en la tabla XX.



	n°CI	n° de familiares estudiados	n° de familiares HBsAg+	n° de familiares HBsAg-HBcAc+	HBcAc-
Agudas	42	130	3	32	95
Crónicos	407	1345	100	308	937
p		NS	<0.05	NS	NS

Tabla XIX. Comparación del estudio de familiares respecto a CI PC o con hepatitis aguda (NS= no significativo).

Sin embargo si suprimimos de ambos grupos los CI UDVP los resultados son los siguientes (tabla XX):

	n°CI	n° de familiares estudiados	n° de familiares HBsAg+	n° de familiares HBsAg-HBcAc+	HBcAc-
Agudas	20	67	3	17	46
Crónicos	383	1275	99	287	890
p		NS	NS	NS	NS

Tabla XX. Comparación del estudio de familiares respecto a CI PC o con hepatitis aguda no UDVP (NS= no significativo).

#### 5.- Comparación de los familiares con CI HbeAc+ respecto a los CI HbeAg+.

Estudiamos los familiares de los PC en función de los marcadores del sistema e del virus, que como ya se ha expuesto se relaciona con el nivel de replicación del virus (tabla XXI)

CI	n°CI	n° de fami- liares	n° de fami- liares HBsAg+ (%)	n° de familiares HBsAg- HBcAc+ (%)	HBcAc- (%)
HBeAg+	37	159	15 (9.4%)	42 (26.4%)	102 (64.1%)
HBeAc+	361	1155	85 (7.3%)	262 (22.6%)	808 (69.9%)
p		NS	NS	NS	NS

Tabla XXI. Comparación del estudio de familiares respecto a CI PC con presencia de HbeAg o HbeAc. (NS= no significativo).

También hemos querido expresar estos resultados haciendo CI a cualquier portador que presentase HbeAg. Es decir hemos comparado los marcadores de los familiares de cualquier portador con HbeAg con aquellas familias en las que ningún miembro lo presentaba, con la variación en los resultados que se observa comparando las tablas XXI y XXII, obteniéndose diferencias estadísticamente significativas en las tasas de infección a favor de los CI HBeAg+.

	n° Por- tado- res	n° de fami- liares	n° de familia- res HbsAg+ (%)	n° de familiares HbsAg- HbcAc+ (%)	HbcAc- (%)
HbeAg+	49	213	36 (16.9%)	56 (26.2%)	121 (56.7%)
HbeAc+	349	1101	64 (5.8%)	248 (22.5%)	789 (71.6%)
p		NS	<0.001	NS	<0.001

Tabla XXII. Comparación del estudio de familiares respecto a unidades familiares con y sin algún miembro HbeAg. (NS= no significativo).

#### 6.- Agregación familiar

Todos los familiares con algún marcador frente al virus se concentraban en torno a 222 CI (el 49,5% de las familias) según la distribución de la tabla XXIV.

n° de familiares con algún marcador	n° de familias (CI)	%
NINGUNO	227	50.5
UNO	142	31.6
DOS	49	10.9
TRES	24	5.3
MAS DE TRES	7	1.5

Tabla XXIV. Agregación en función del número de familiares con algún marcador.

También encontramos una marcada agregación familiar en cuanto a los nuevos portadores encontrados (n=103), que como ya se ha mencionado resultaron ser el 7% del total de familiares estudiados. Estos se concentran en tan solo un 14% de las familias estudiadas (tabla XXV).

n° de familiares HbsAg+ (n=103)	n° de familias (n=449)	%
NINGUNO	384	85.9
UNO (43)	43	9.6
DOS (22)	11	2.2
TRES (24)	8	1.8
MAS DE TRES (14)	3	0.4

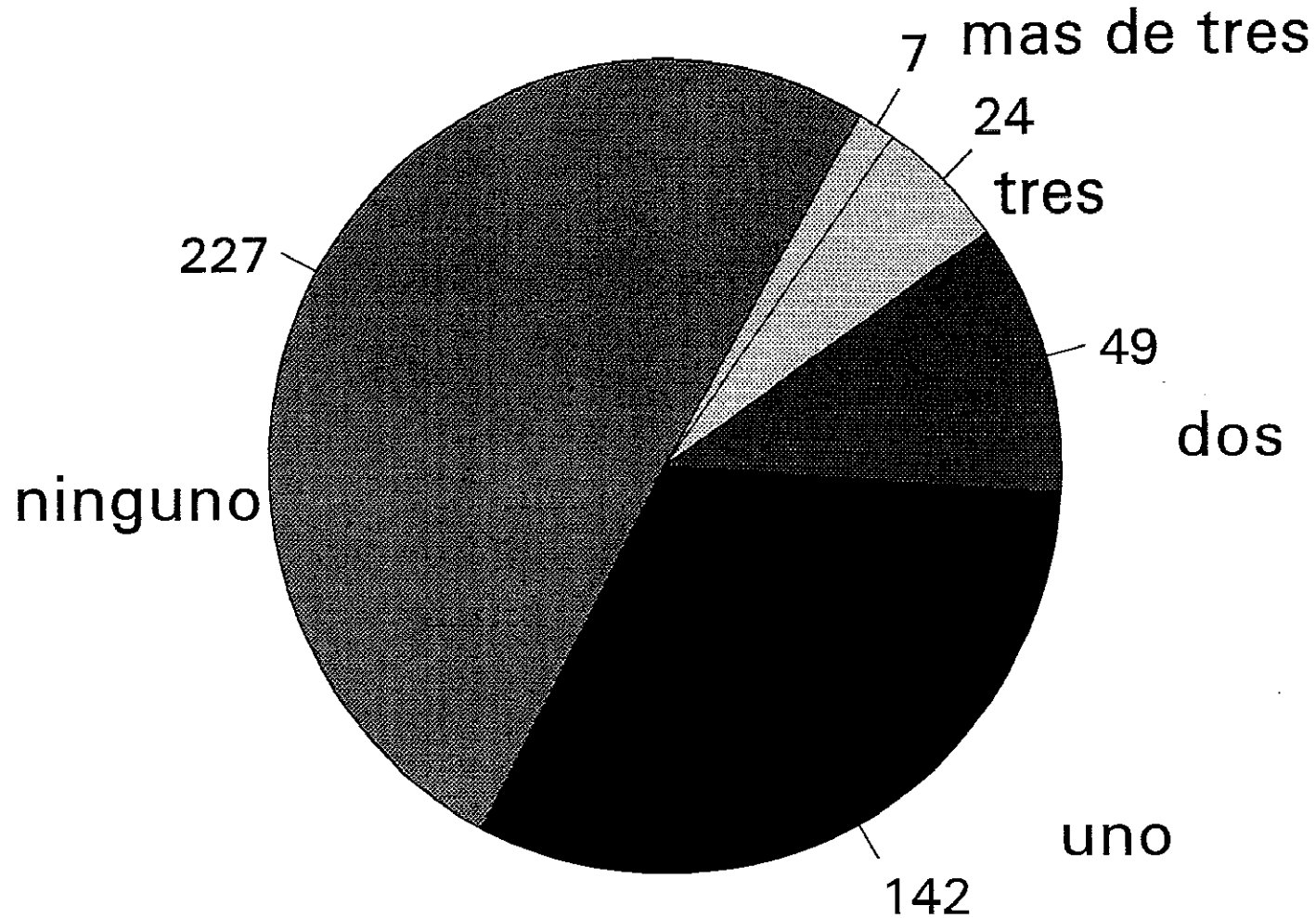
Tabla XXV. Agregación en función de nuevos PC encontrados dentro de una familia.

Destaca que de 103 nuevos PC encontrados, casi un 60% se localizara en tan solo 22 familias (5% del total de familias estudiadas), en las cuales se encontraron dos o mas individuos HbsAg+.

Las tablas XXIV y XXV se representan gráficamente en las figuras 9.1 y 9.2.

# Figura 9.1 Agrupacion familiar de marcadores

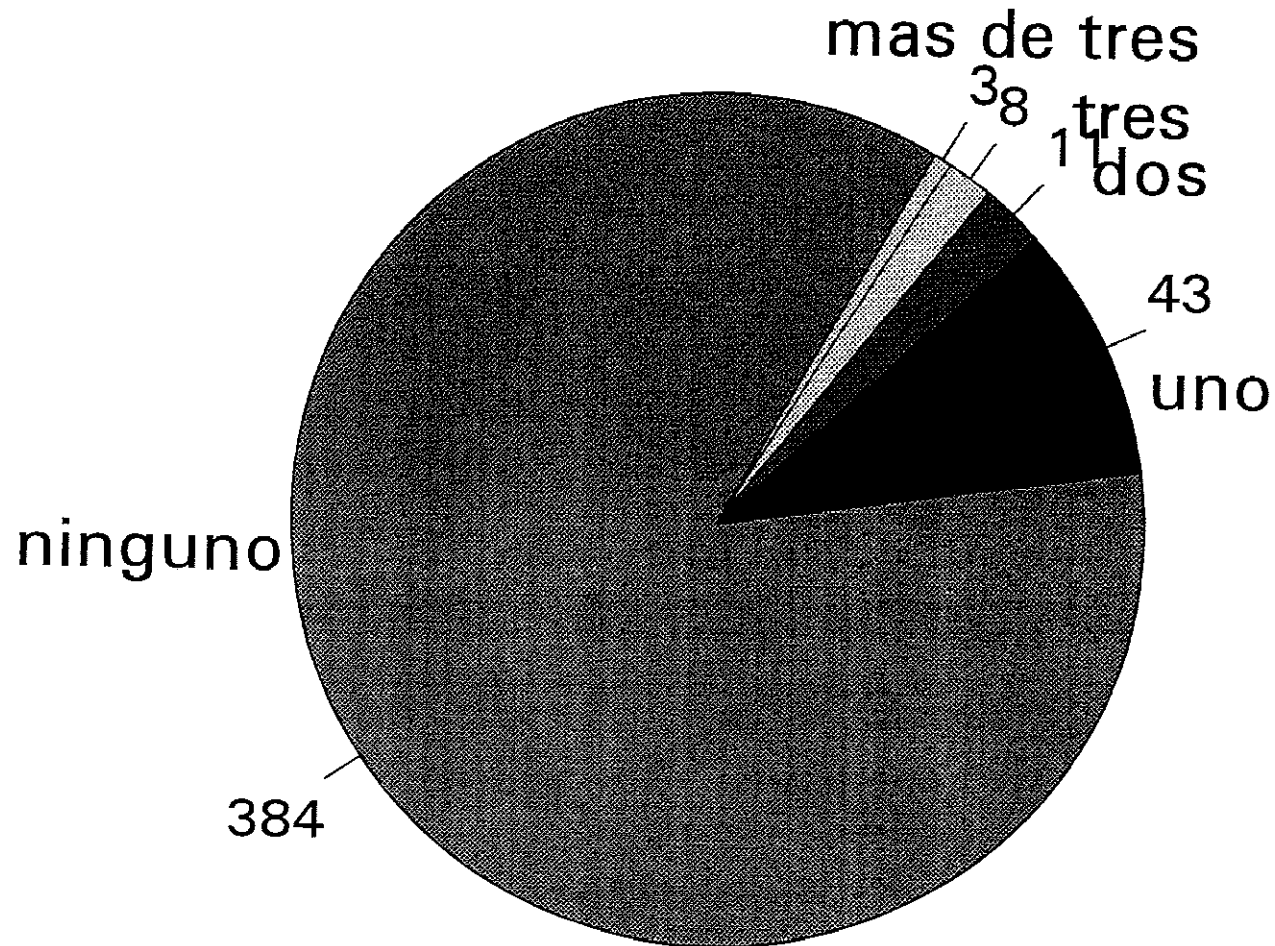
N = numero de familias (digito)



numero de familiares con algun marcador (letras)

# Figura 9.2 Agrupacion familiar de marcadores

n = numero de familias (digitos)



7.- Infección por VHD

Fueron estudiados 402 CI de los cuales fueron anti-VHD+ 28 (6.96%). 27 de ellos eran ADVP.

## B. Estudio de familiares con marcadores atípicos

### 1.- Familiares con HbcAc aislado (HbsAg- HbcAc+ HbsAc-)

Solo se halló este perfil serológico en 58 individuos (4% del total) cuya reactividad se confirmó mediante dos métodos ELISA, cuya relación familiar con el CI y edad media se expresa en la tabla XXVI. Así mismo se presentan los resultados obtenidos con ensayo HbcAc con tratamiento con metabisulfito (MBS), respuesta a 1 o 3 dosis de vacuna y presencia de ADN-VHB mediante PCR.

Relación Familiar (Edad media)	n° HbcAc+ aislado	n° HbcAc MBS +	n°Resp 1 d	n°Resp 3 d	n°no resp	n° ADN VHB+ por PCR
Padres (52)	16	14	7	4	5	0/12
Madres (49)	13	11	6	4	3	0/10
Esposos (38)	9	7	3	4	2	0/8
Esposas (33)	5	4	2	2	1	0/4
Hijos (13)	3	0	0	3	0	0/2
Hijas (9)	2	0	0	2	0	0/1
Hermanos (25)	6	3	1	3	2	0/4
Hermanas (19)	4	1	0	3	1	0/2
<b>TOTAL</b>	<b>58</b>	<b>40</b>	<b>19</b>	<b>25</b>	<b>14</b>	<b>0/43</b>

Tabla XXVI . Datos globales del estudio HbcAc-MBS en familiares con HbcAc aislado, respuesta a la vacuna y detección de ADN VHB por PCR.

Por lo tanto presentaron este perfil un 15% de los padres, un 10% de las madres, un 4% de los cónyuges, un 4% de los hermanos y un 0.9% de los hijos, lo que refleja una relación directa de la incidencia de este perfil con la edad.



La reactividad de los ensayos serológicos HbcAc y HbcAc-MBS (ELISA automatizado, ES700 Boehringer Mannheim) de los distintos grupos de familiares con HbcAc aislado se expone detalladamente por ser un ensayo de investigación en las figuras 10 a 13, expresada en función del ratio (absorbancia del punto de corte/absorbancia de la muestra) y correlacionada con la respuesta a la vacuna. Se ha de tener en cuenta que al ser un ensayo competitivo se consideran positivos los sueros con ratio menor a 1 y negativos los de ratio mayor a 1.

El resultado con mayor relevancia se puede considerar el de la ausencia de ADN viral en suero de todos los individuos estudiados (14 no respondedores a la vacuna, 16 que respondieron a una dosis y 13 que respondieron a tres dosis). Por otra parte se puede decir que 19 individuos (32.7%) respondieron de forma anamnésica a la administración de una dosis de vacuna y en 18 de ellos se confirmó la reactividad HbcAc con ensayo con MBS. Por el contrario de los 25 (43.1%) que requirieron tres dosis de vacuna (respuesta primaria) solamente diez fueron reactivos en el ensayo con MBS (uno de ellos con reactividad límite). De los 14 individuos restantes (24.1%) que no respondieron a 3 dosis de vacuna, 12 mantuvieron la reactividad en el ensayo aunque todos ellos fueron ADN-VHB negativo por PCR, como ya se ha expuesto anteriormente.

El ensayo HbcAc con MBS también se aplicó a 30 sueros de individuos HbsAg+ HbcAc+ y a otros 50 de individuos HbsAg- HbcAc+ HbsAc+, con el fin de controlar la reactividad en sueros con HbcAc+ conocido, con los resultados expresados en las figuras 14 y 15. En síntesis se puede decir que todos ellos fueron positivos en el primer grupo aunque un suero del segundo grupo tuvo una reactividad límite (ratio 1.05) y otro resultó negativo. También se representa en la figura 16 el resultado del estudio de un panel de 30 sueros con resultado dudoso y de alta probabilidad de ser falsos positivos (menores de 25 años con HbcAc aislado), siendo negativos 23 de ellos (76.6%) al ser tratados con MBS.

En cuanto a los controles negativos se ensayaron 30 sueros de pacientes HbcAc- por este método sin que fuera reactivo ninguno de ellos (figura 17).

La evaluación del ensayo HBcAc-MBS la podemos expresar respecto a los sueros en los cuales tenemos la certeza de ser verdaderos positivos, que son: 40 HBsAg+ HBcAc+, 50 HBsAg- HBcAc+ HBsAc+ y 19 HBsAg- HBcAc+ HBsAc- con respuesta a una dosis de vacuna, y en base a los 30 sueros HBcAc- por el ensayo convencional con los siguientes resultados:

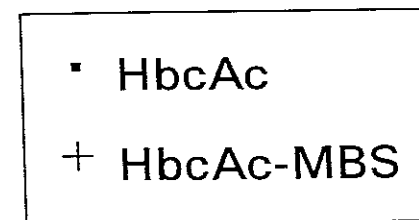
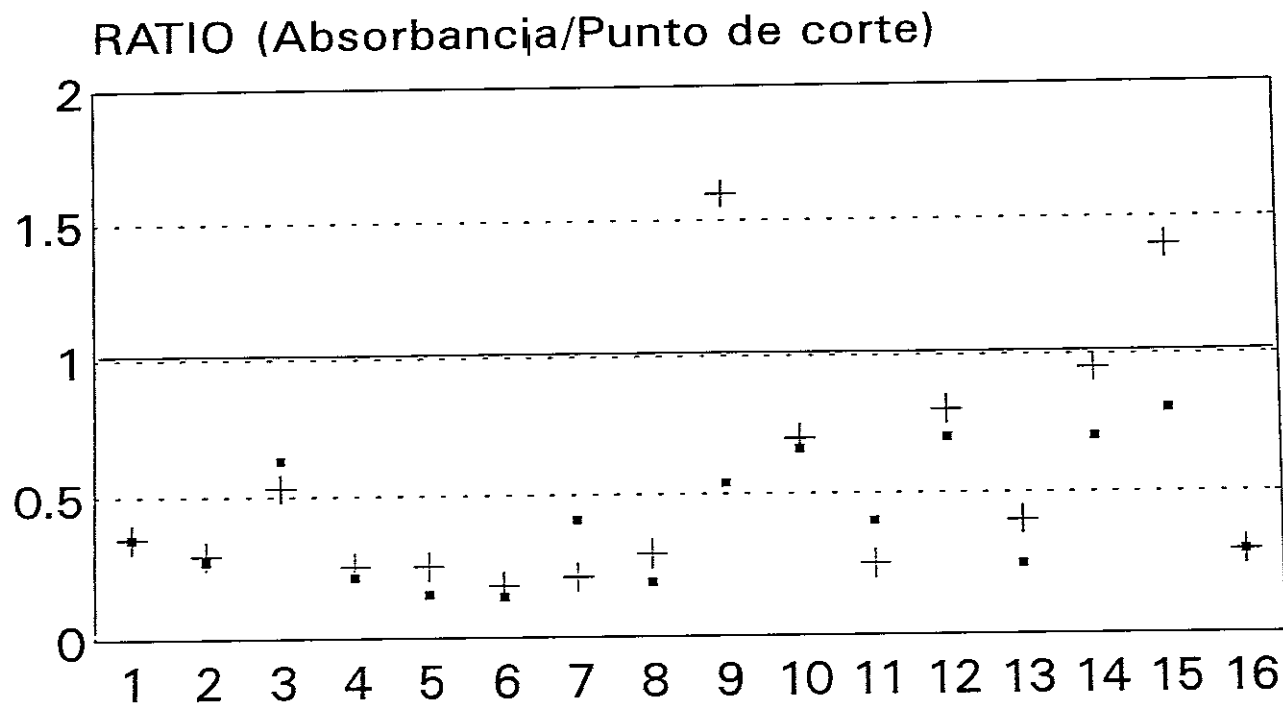
	HBcAc+ MBS	HBcAc- MBS
HBcAc+	106	3
HBcAc-	0	30

Tabla XXVII. Comparación del ensayo HBcAc con y sin MBS respecto a sueros de reactividad conocida.

Por lo tanto presentó un 97% de sensibilidad, 100% de especificidad, 100% de valor predictivo positivo y 90% de valor predictivo negativo.

Figura 10

Reactividad de los ensayos HBcAc: Padres con HbcAc aislado



Vacuna	0	1	1	1	0	1	1	1	3	3	0	1	0	3	3	0
--------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

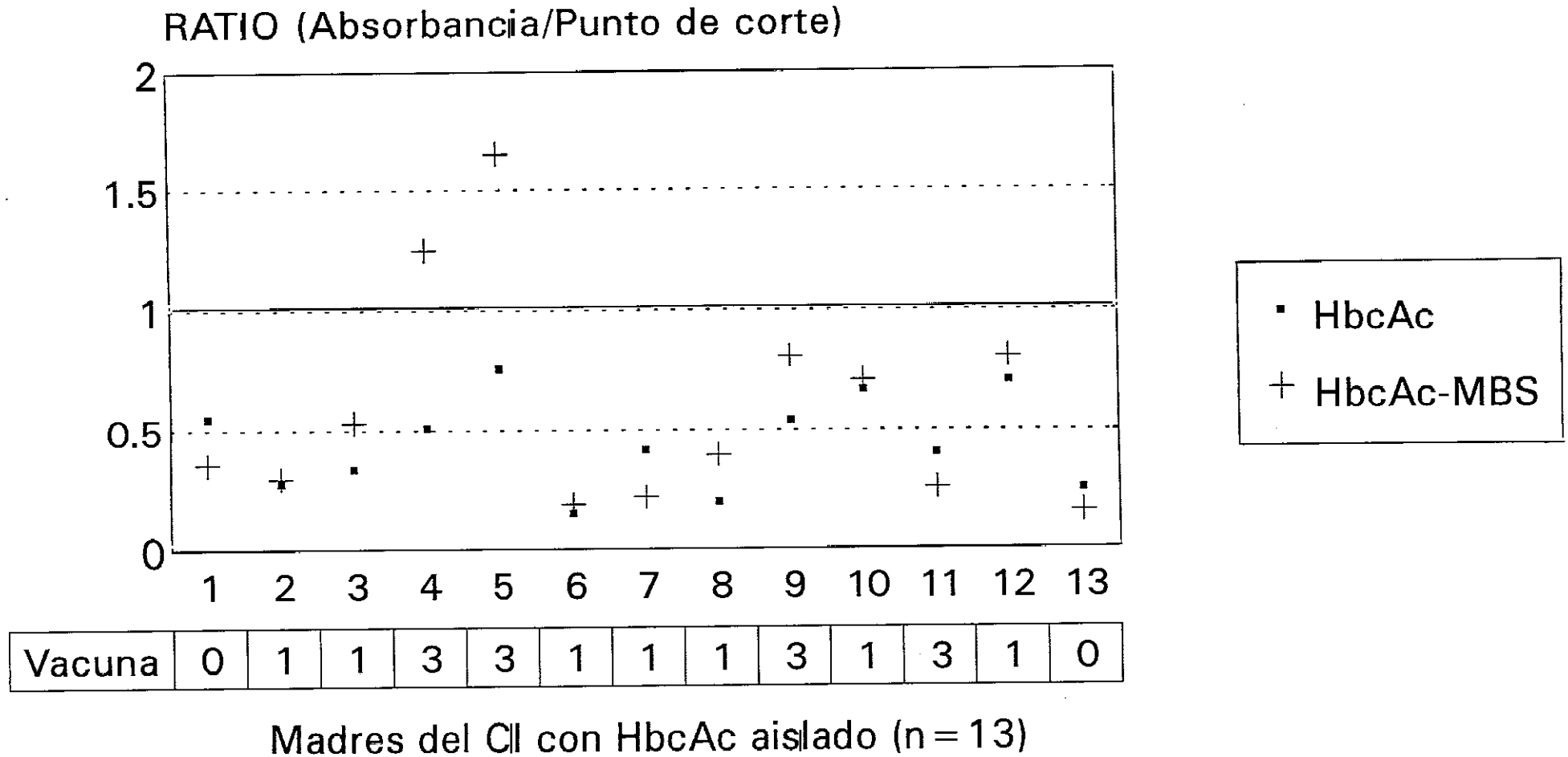
Padres del CI con HbcAc aislado (n = 16)

Respuesta a la vacuna:

0 no responden 1 Responden con una dosis 3 Responden con tres dosis

# Figura 11

## Reactividad de los ensayos HBcAc: Madres con HbcAc aislado

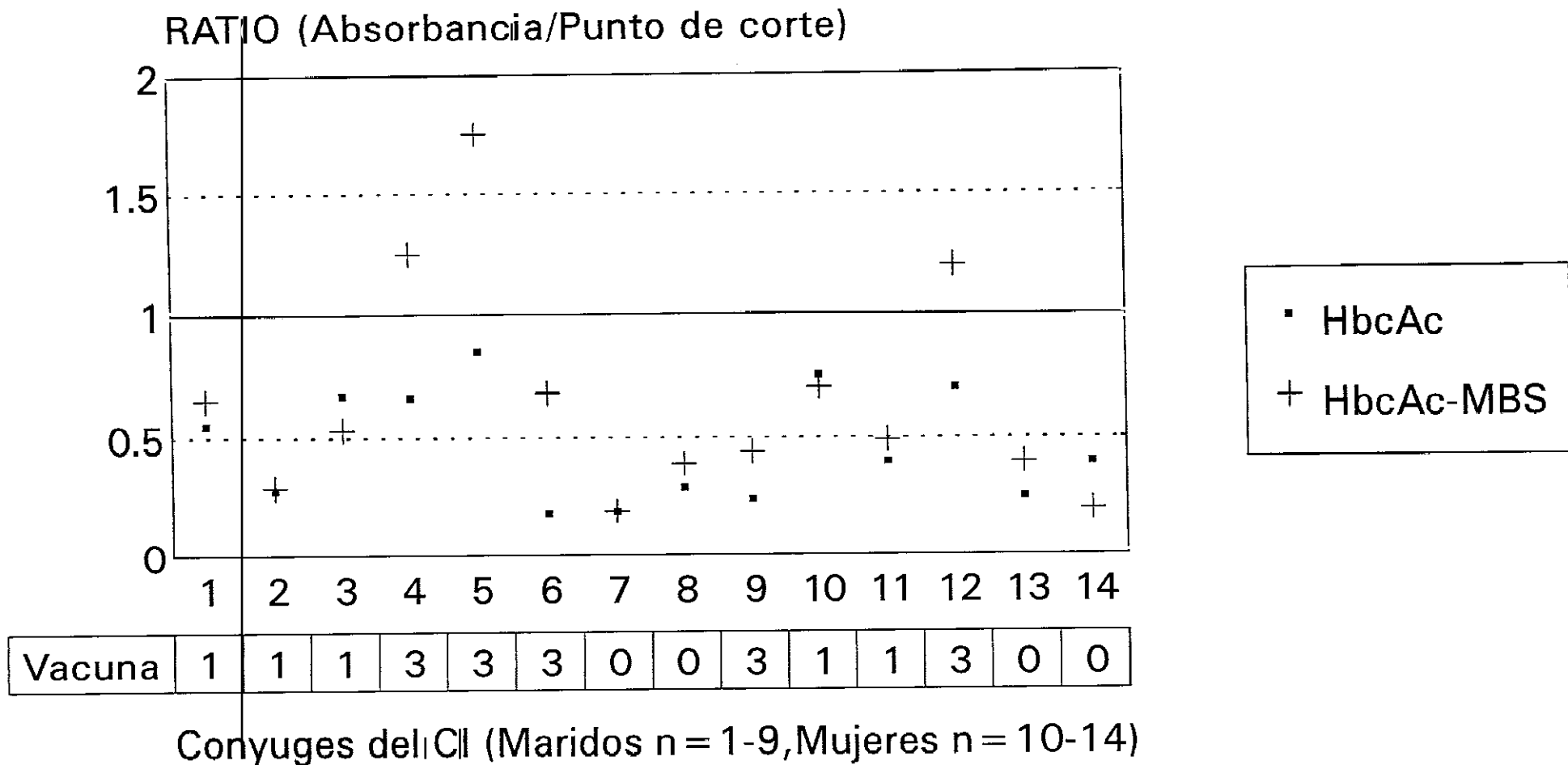


Respuesta a la vacuna:

0 no responden 1 Responden con una dosis 3 Responden con tres dosis

Figura 12

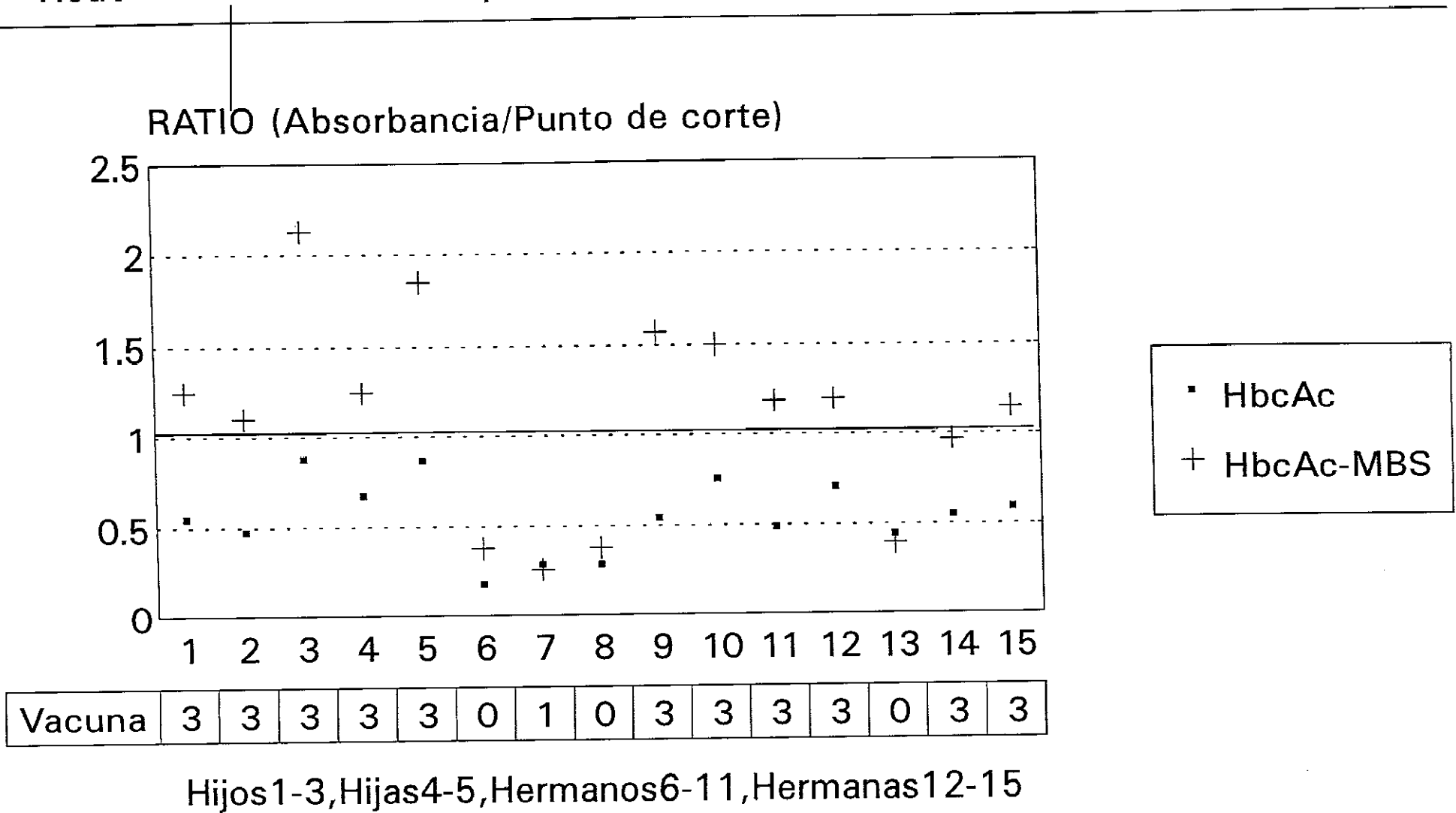
Reactividad de los ensayos HBcAc: Conyuges con HbcAc aislado



Respuesta a la vacuna:

# Figura 13

Reactividad de los ensayos HBcAc: Hijos y Hermanos con HbcAc aislado



Respuesta a la vacuna:

0 = no responde, 1 = Responde con una dosis, 2 = Responde con tres dosis

Figura 14

Reactividad de los ensayos HBcAc: Controles HbsAg + HbcAc +

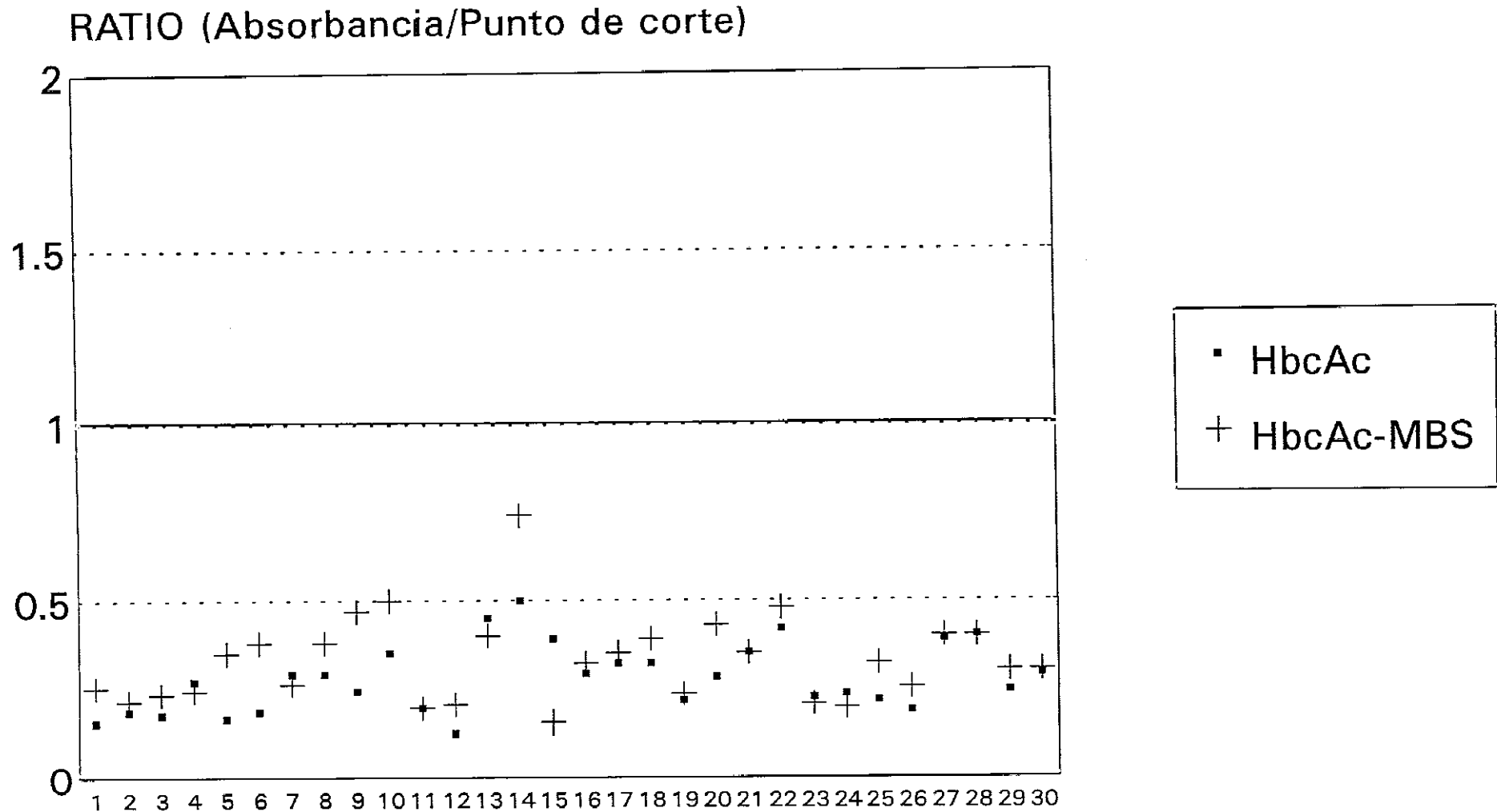




Figura 15 (I)

Reactividad de los ensayos HBcAc: Controles HbsAg-HbcAc + HbsAc +

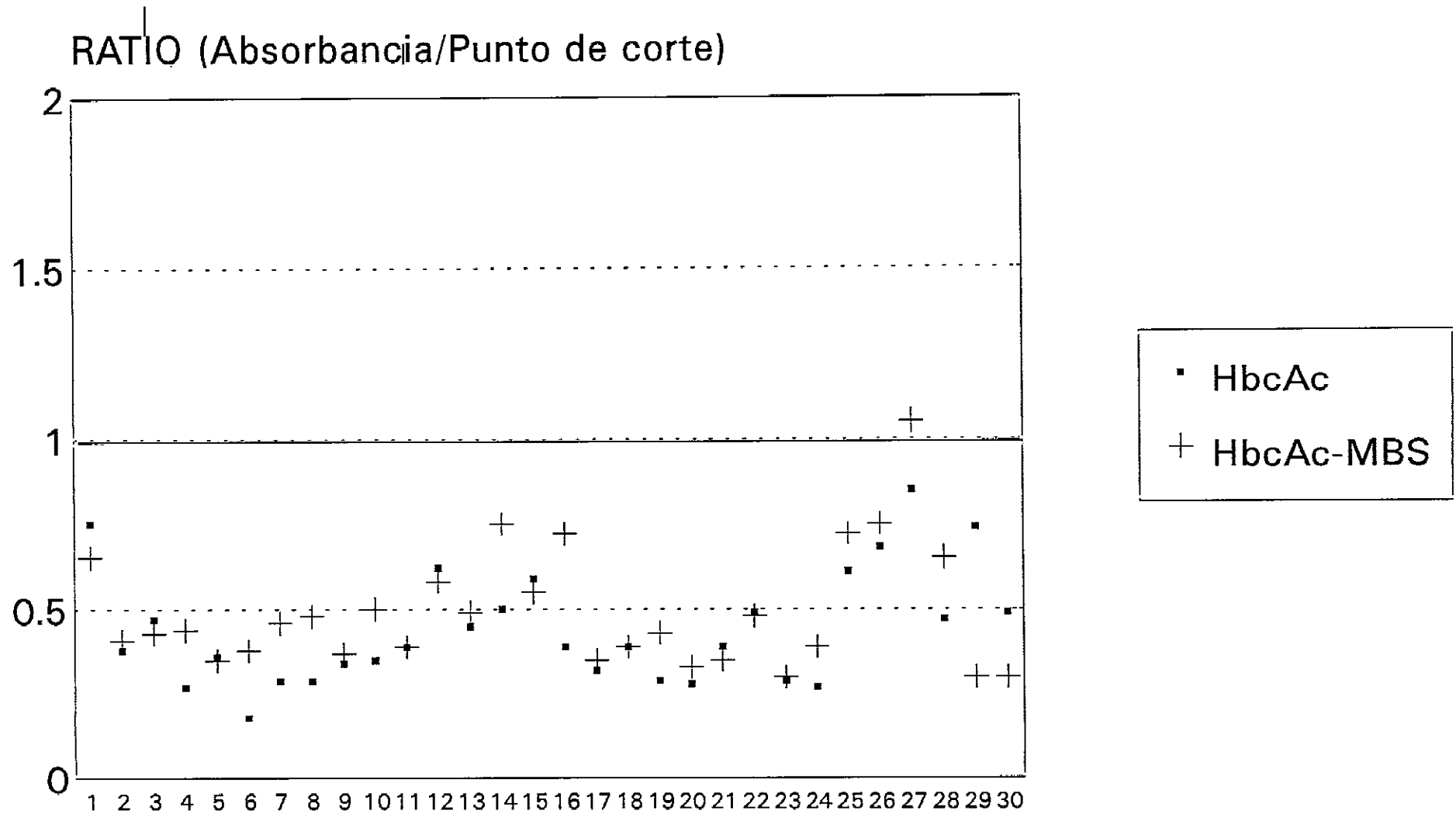


Figura 15 (II)

Reactividad de los ensayos HBcAc: Controles HbsAg-HbcAc + HbsAc +

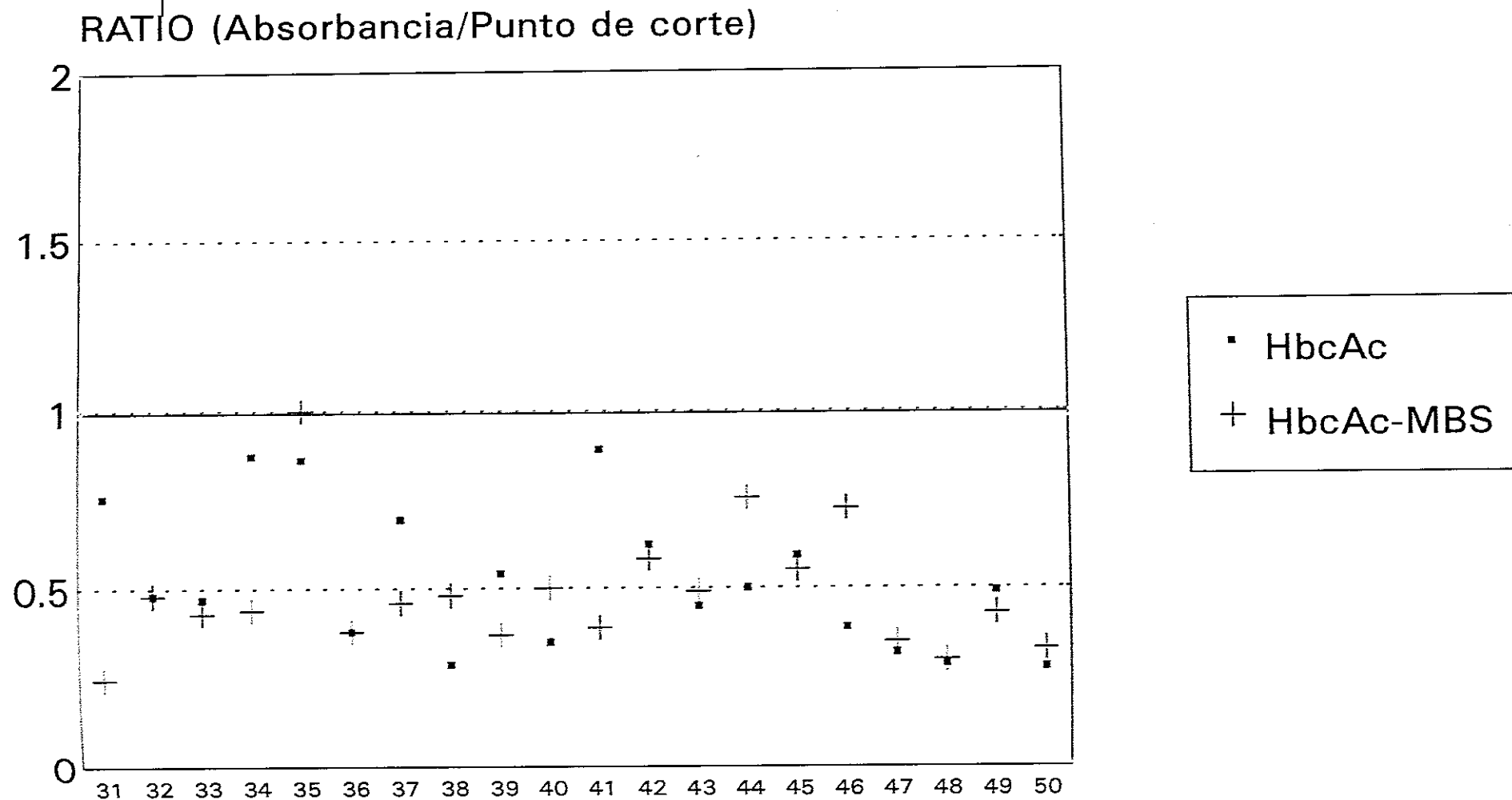


Figura 16

Reactividad de los ensayos HBcAc: Dudosos HbcAc

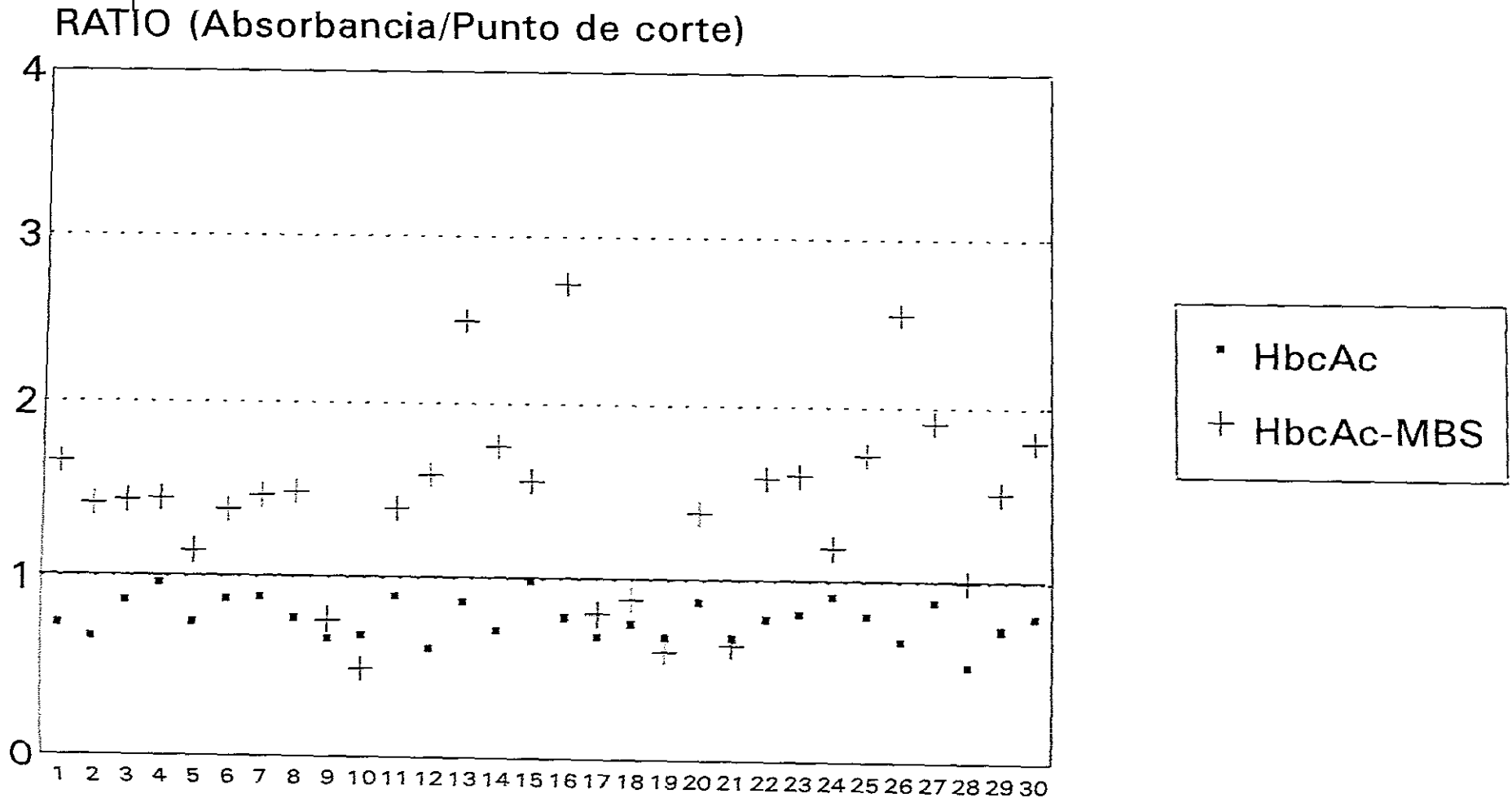
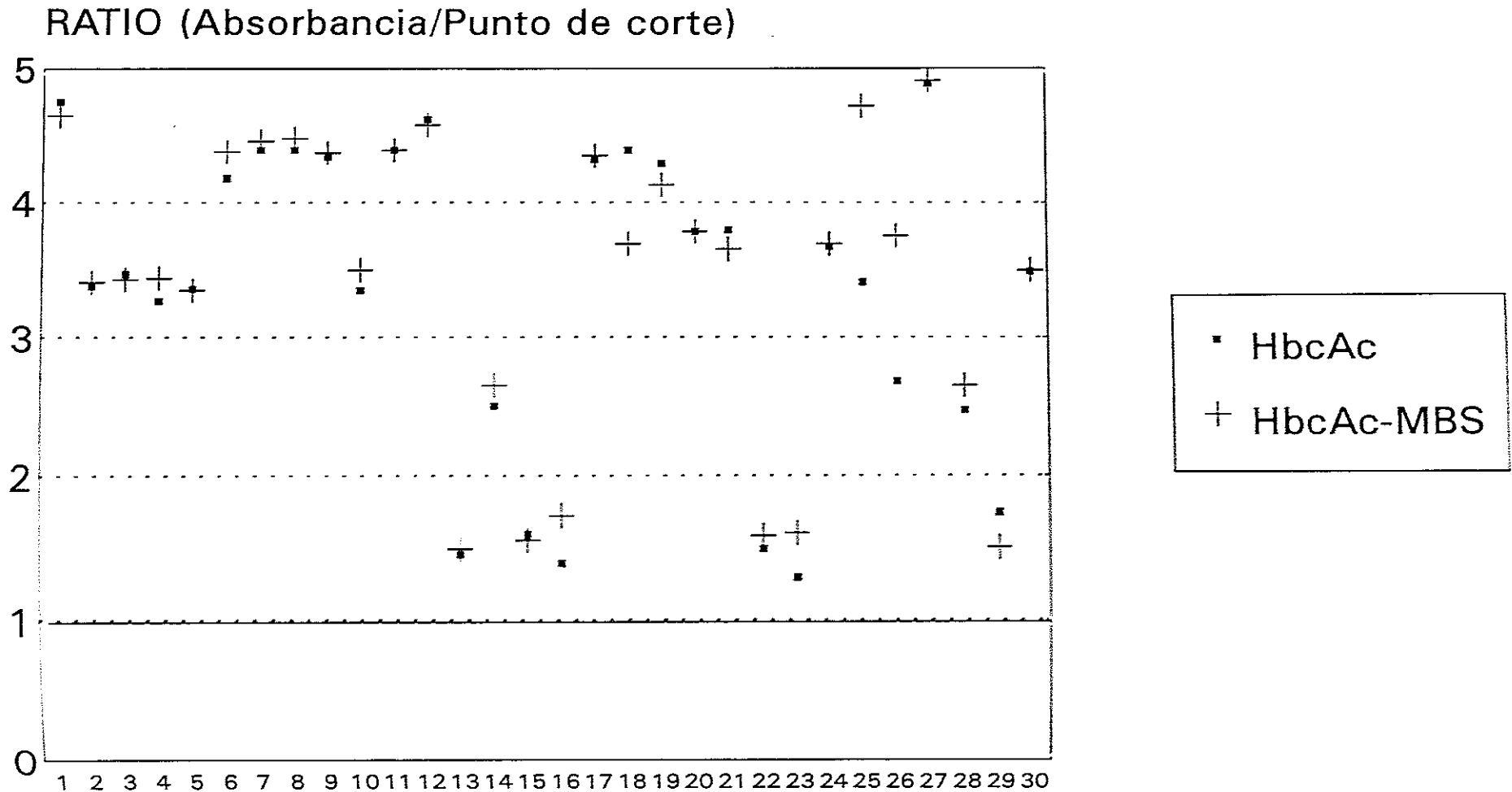


Figura 17  
Reactividad de los ensayos HBcAc: Controles HbcAc-



## 2.- Vacunación natural (HbsAc aislado)

El estudio se realizó con el fin de vacunar a los familiares de portadores crónicos no inmunes al virus, para lo cual lo mas habitual es analizar la presencia de HbcAc, procediendo a vacunar a los seronegativos. Para determinar la incidencia del perfil de HBSAc aislado se escogieron aleatoriamente algunos familiares de primer grado respecto al CI que eran HbcAc- con los resultados mostrados en la tabla XXIII.

Parentesco	n° HbcAc-	n° HbsAc+ (%)
Madre	24	1 (4.1%)
Padre	18	0
Hijo	25	1 (4.0 %)
Hija	24	0
Marido	23	0
Mujer	23	1 (4.3%)
Hermana	24	1 (4.1%)
Hermano	24	0
<b>TOTAL</b>	<b>187</b>	<b>4 (2.1%)</b>

Tabla XXIII. Familiares con HbsAc como único marcador previo a la vacunación.

Los cuatro casos encontrados presentaban títulos superiores a 100 UI/l y presentaban la siguiente edad: madre 48, mujer 37, hermana 33 e hijo 14 años.

## C.- Resultados del programa de vacunación

Aunque este trabajo no pretende ser un estudio en profundidad sobre respuesta a la vacuna, ya que aunque se ha utilizado un ensayo cuantitativo para la detección del HbsAc no se ha realizado con precisión el título exacto alcanzado, si queremos exponer los resultados obtenidos sobre aceptación de la vacuna y respuesta a la misma de los principales grupos de familiares estudiados.

El resultado global es que se ha conseguido vacunar al 96% de la población diana (aunque solo un 91% cumplió el protocolo íntegramente), gracias a una continua labor de recuerdos telefónicos y postales del personal del INSALUD. La tasa global de respuesta a la vacuna fue del 96%.

No cumplieron el protocolo por rechazo de la vacuna o por no acudir a la administración de alguna dosis o al posterior control serológico 134 familiares (9% del total), de los cuales 17 (16%) eran padres, 9 (7.2%) madres, 40 (12.6%) cónyuges (de los cuales el 90% eran varones), 41 (7.6%) hijos y 27 (10.7%) hermanos del CI. Las causas de incumplimiento del protocolo fueron 20.8% rechazo a la vacunación, 33.5% no acudir a la administración de alguna dosis y 45.7% no realizarse el control serológico posterior. Los que cumplieron el protocolo presentaron las siguientes tasas de respuesta a la vacuna: 80.2% en padres, 91.9% en madres, 93.5% en cónyuges, 99.5% en hijos y 97.2% en hermanos del CI.

## DISCUSION

La discusión se realizará siguiendo el esquema de trabajo planteado, comenzando por el estudio de difusión intrafamiliar del virus con especial mención del estudio de subtipos, para continuar con los marcadores atípicos y finalizar con los resultados de la vacunación.

## **A. Difusión intrafamiliar**

### **1.- Casos Índice**

En este punto nos gustaría resaltar que nuestra serie es la mas larga publicada hasta la fecha por lo que las conclusiones a las que podamos llegar tienen mayor validez. En cuanto a la distribución por edad y sexo (figura 3 ) destaca el predominio de varones (58%), salvo en la década de los treinta, motivado este hecho probablemente por el cribado rutinario de HbsAg que se realiza en nuestro Area durante la gestación, lo que ha llevado a una mayor detección de mujeres HbsAg+ en este grupo de edad, a pesar de que sea mas frecuente la infección crónica en el varón.

En cuanto a los pacientes ADVP destaca el bajo número de CI estudiado (46) a pesar de la alta frecuencia de infección en ellos, debido a la especial idiosincrasia de este tipo de pacientes que hace que sea difícil el contacto con ellos y sus familiares. Este hecho no presenta relevancia para los estudios de difusión intrafamiliar ya que en la mayor parte de estos pacientes la infección se va a adquirir fuera del entorno familiar, aunque ellos posteriormente se puedan constituir en potenciales focos de diseminación intrafamiliar del virus.

### **2.- Difusión intrafamiliar del VHB**

A lo largo de la exposición realizada ha quedado patente la importancia de la difusión intrafamiliar del VHB, basada tanto en los datos de la literatura como en los de este trabajo. Pero hay una serie de resultados que merece la pena resaltar, y que



quizá hasta la fecha no se haya tenido en cuenta su significado.

Los resultados obtenidos confirman los de todos los trabajos anteriores realizados, y es que los familiares de portadores crónicos son un grupo de riesgo para el VHB. Así de los familiares estudiados un 7% fueron portadores crónicos HbsAg+ y un 30.6% habían sufrido la infección, ambas cifras superiores a las encontradas en población general en nuestro país (1.0-1.5% HbsAg+, 15-20% HbcAc+). Pero al desglosar los datos en función del parentesco, observaremos que la relación familiar con el caso índice presenta una gran importancia en cuanto al tipo de infección padecida, con los siguientes resultados obtenidos en orden decreciente:

Hermanos	16.7% HbsAg+, 46.4% HbcAc+ (TC 36.2%)
Madres	14.4% HbsAg+, 56 % HbcAc+ (TC 25.7%)
Hijos	5.9% HbsAg+, 15.4% HbcAc+ (TC 32.5%)
Padres	4.7% HbsAg+, 52.8% HbcAc+ (TC 8.9%)
Cónyuges	2.8% HbsAg+, 34.8% HbcAc+ (TC 8.1%)
Otros	1.4% HbsAg+, 13.1% HbcAc+ (TC 11.1%)

Salvo este último grupo, todos los familiares de primer grado presentan incidencias superiores a las obtenidas en el estudio de seroprevalencia de la CAM (1.9% HbsAg+, 20.9% HbcAc+, TC 9%). Pero podemos distinguir con porcentajes superiores al 5% de portadores crónicos a los hermanos, madres e hijos del CI, todos ellos con altas tasas de cronicidad, e inferiores al 5% y con tasas de cronicidad similares a los de población normal a los padres, cónyuges y otros convivientes. En cambio el orden en cuanto al total que han sufrido la infección sigue una

distribución distinta ya que los grupos con mayores porcentajes son los padres y las madres, seguido de hermanos y cónyuges y por último los hijos y otros convivientes. Estos datos se justifican mediante dos premisas fundamentales:

- Importancia de la transmisión vertical

- A mayor edad mayor riesgo de haber sufrido la infección, lo que implica indefectiblemente una transmisión horizontal

Ambas premisas han sido descritas previamente y se sabe que en la infección del VHB tienen importancia tanto la transmisión vertical como la horizontal, pero en ningún trabajo se ha cuantificado el posible número de casos que genera cada vía en nuestro país, aunque sí se ha expuesto anteriormente el número de casos teóricos generados por la transmisión vertical, que coincide con los hallados en estudios epidemiológicos. Este dato presenta una gran trascendencia para la instauración de campañas de vacunación, ya que hay discusión en cuanto a realizarlas en adolescentes o en neonatos, que representarían estrategias de prevención de la transmisión horizontal y vertical respectivamente. Vamos a intentar en base a nuestros datos analizar algunos de los factores implicados en la difusión del VHB.

### **Edad**

En cuanto a la influencia de la edad, se sabe que cuanto mas años de convivencia haya con el CI hay mayor riesgo de infección. Así mismo cuando se han realizado estudios estratificados por edades se encuentran mayores prevalencias a mayor edad. Esto es

debido a un número mayor de exposiciones al virus (transmisión horizontal), lo que justificaría que en nuestro estudio los grupos de mayor edad (padres, madres, cónyuges) presenten las mayores tasas de infección. Dentro de este tipo de transmisión presenta una gran importancia la vía sexual, pero no hemos constatado una mayor infecciosidad del varón ya que obtenemos similares tasas de infección en cónyuges independientemente del sexo.

Pero este tipo de transmisión no explicaría el porque el grupo de hermanos se sitúa en tercer lugar, a pesar de presentar una edad media de 20 años (ver tabla X) siendo menores de 30 años el 80% de los que han sufrido la infección, por lo que en este grupo ha de estar implicada la transmisión vertical como se verá a continuación.

#### **Transmisión vertical**

Las tasas de cronificación para la transmisión vertical son del 90-100% y del 5-10% para la transmisión horizontal en inmunocompetentes. En tres grupos de familiares se manifiesta la carga de la transmisión vertical que son los hermanos, los hijos y las madres del CI, grupos de muy alta tasa de cronificación (25-36%) frente al resto de los grupos que presentan tasas de cronificación cercano a la normalidad como son los padres, cónyuges y otros convivientes (8-16%), a pesar de que la tasa de infección es superior al de población normal. Este hecho en inmunocompetentes solo se justificaría en base a que en el primer grupo se adquiriese la infección en los primeros periodos de la vida.

Para evaluar la importancia de la transmisión vertical nos vamos a centrar en el grupo de hermanos, hijos y madres del CI. De los 27 hijos HbsAg+ encontrados, 23 lo eran de madre HbsAg+, 3 de padre HbsAg+ y 1 de padre y madre HbsAg+. En los 3 hijos de padre HbsAg+ encontrados la madre presentaba una serología de haber pasado la infección por el virus (HbsAg-, HbcAc+, HbsAc+), por lo que aunque es posible una infección vertical, los cuantificaremos como que han sufrido una infección por vía horizontal. Suponiendo que en los hijos de madre HbsAg+ la carga de la transmisión horizontal fuese similar a la del grupo de hijos de padre HbsAg+, podemos especular que en 20 de 26 PC la infección fue por vía vertical. Por lo tanto la transmisión vertical probablemente sea responsable de más del 75% de los PC hallados en edades tempranas de la vida (edad media de 16 años en nuestro estudio) cuya madre sea HbsAg+.

Las madres de los CI también presentan una alta tasa de HbsAg+ (14%), que asciende casi al 20% cuando suprimimos los CI UDVP, en los cuales existe un riesgo claro de infección extrafamiliar. Por lo tanto 1 de cada 5 PC cuya madre fue estudiada, esta también lo era, lo que sugiere fuertemente una transmisión vertical.

El grupo de hermanos de los CI fue el que presentó mayores tasas de HbsAg+ (16.7%), probablemente debido a la fuerte influencia de la transmisión vertical, unido a una mayor edad media que hace que se manifieste también la influencia de la transmisión horizontal. Los 42 individuos HbsAg+ detectados se agrupaban en 28 unidades familiares. De estas 28 se pudo estudiar serológicamente a la madre en 22 casos que correspondía a un

total de 36 hermanos HbsAg+. En 18 de estas 22 (81%) se documentó infección por el VHB en un 81%, siendo 7 (32%) HbsAg+. Por lo tanto 11/36 (30.5%) de los hermanos HbsAg+ tenían una madre que también era PC. Por el contrario tan solo 4/22 (18%) de las madres no habían estado en contacto con el virus, agrupándose en estas familias 7 hermanos HbsAg+ en los cuales se puede asegurar que su infección se había producido por vía horizontal.

De modo que en este grupo hemos obtenido un 19.4% de PC infectados por vía horizontal y un 30.5% de alta probabilidad de transmisión vertical, siendo el resto de origen incierto.

Es difícil conocer con exactitud el número de PC que deben su situación a una transmisión vertical en nuestro país, pero en base a nuestros datos podemos decir que oscila entre un 20 y un 75% de los casos, dependiendo de la edad del individuo. Por lo tanto cuanto mas joven sea y no presente otros factores de riesgo para la infección (UDVP...), mayores probabilidades de que la infección provenga de la madre. Es posible que algunos casos no sean debidos a transmisión estrictamente vertical, sino por contacto materno en los primeros periodos de la vida, pero en cualquier caso nuestros datos nos llevan a una conclusión de gran trascendencia en la actualidad sobre la controversia de los planes de vacunación y es abogar por una política de inmunización neonatal, o en caso contrario por establecer la obligación de realizar el cribado rutinario de HbsAg durante la gestación (o ambos). Probablemente la mejor estrategia en la actualidad sea la de realizar el cribado de HbsAg en gestantes unido a una vacunación universal a los diez años de edad, como se ha recomendado recientemente<sup>265</sup>, mientras no se tengan datos

fidedignos de la efectividad a largo plazo de la vacuna, pues sino lo mas eficaz sería sin lugar a dudas la vacunación universal al nacer<sup>266-267</sup>.

Nuestras especulaciones pueden parecer contradictorias respecto a las consideraciones teóricas sobre transmisión vertical de Bruguera expuestas en el punto 7 o las obtenidas con otros estudios epidemiológicos (tasas en torno al 0.2% de PC en la infancia), pero nuestra sospecha es que a las tasas de transmisión perinatal habría que añadirle las que se dan en las primera etapas de la vida hasta la juventud, en las cuales se ha podido minusvalorar el foco infeccioso intrafamiliar. En estas etapas probablemente haya una mayor tendencia a desarrollar una infección crónica, con independencia del sexo, lo que justificaría que no hayamos encontrado diferencias significativas respecto a este parámetro en los nuevos PC hallados en los grupos de hermanos e hijos del CI, y que a su vez son los que presentan mayores TC. Estas observaciones van a ser reafirmadas por la distribución de subtipos del virus encontrada que se discutirá a continuación, así como por trabajos de reciente publicación en los cuales también se encuentran altas TC en la infancia a pesar de descartarse una transmisión vertical, como en el de Vegnente et al que encuentran una TC del 73.4% en niños a pesar de que solo era posible una transmisión vertical en el 1.7% de los casos, frente a un 35.6% en adultos<sup>258</sup>.

### **3.- Subtipos virales**

Los resultados arrojan un balance de un 37% de PC del subtipo ad frente a un 63% del subtipo ay, balance similar al de

otros estudios realizados en nuestro país o en nuestra comunidad autónoma, mereciendo la pena destacar que nuestro estudio es el mas amplio realizado en nuestro país hasta la fecha en una misma área geográfica. Pero la distribución de subtipos respecto a unidades familiares es espectacular: salvo en un caso (CI-V) hay coincidencia del subtipo de virus en todos los PC de una misma familia. Este hallazgo apoya sin lugar a dudas que el origen de la infección en la mayor parte de los casos sin otros factores de riesgo es intrafamiliar. En el CI-V el padre pertenecía al subtipo ad mientras que la madre y los dos hijos del ay lo que apoyaría en cierto modo la importancia de la transmisión vertical o al menos la mayor significación de la madre como foco infeccioso en los primeros años de la vida.

Por lo tanto hemos objetivado que presentaban el mismo subtipo viral un 96.66% de los PC del VHB pertenecientes a una familia, lo que demuestra sin lugar a dudas la transmisión intrafamiliar del virus.

#### **4.- Comparación de los marcadores de familiares de casos de hepatitis aguda con los de portadores crónicos.**

En la controversia sobre este tema, en el cual en algunos trabajos se obtienen diferencias significativas y en otros no, nuestra opinión es que no tiene porque haberlas si todo el estudio se centra en difusión intrafamiliar. Es decir que juega gran importancia si el CI ha adquirido su infección dentro o fuera del entorno familiar. Así cuando realizamos el estudio global sí encontramos diferencias significativas, mientras que

si suprimimos los CI ADVP, donde existe una causa clara de infección extrafamiliar, estas desaparecen. Esto es debido a que en hepatitis agudas sin factores de riesgo la probabilidad de que el foco de infección esté en el entorno familiar es alta, por lo que se pueden encontrar tasas de infección por el virus similares en familiares de PC o de hepatitis agudas.

#### 5.- Comparación de los familiares con CI HbeAc+ respecto a los CI HbeAg+.

En este punto también hay muchas contradicciones en la literatura, ya que como se expuso en el apartado 7 de la Introducción (página 40) podemos encontrar múltiples trabajos que presentan diferencias significativas mientras que en otros tantos no. Es evidente que cuanto mayor sea la viremia de un PC mayor potencial infeccioso presenta, y como esta se relaciona directamente con la presencia de HbeAg es lógico pensar que existan diferencias. En la comparación de los CI HbeAg+ respecto a los HbeAc+ de nuestra serie no llegamos a diferencias estadísticamente significativas, aunque si una tendencia a mayor número de familiares infectados en CI HbeAg+. Este hecho se suele explicar en base a que los estudios de este tipo, igual que el nuestro, son puntuales, y el CI que encontramos HbeAc+ en su día fue también HbeAg+ siendo en ese momento cuando pudo infectar a un número mayor de familiares. Por otra parte no habría que olvidar que en países del Area Mediterránea son frecuentes los mutantes de precore, que justificaría un mayor nivel de replicación viral en pacientes HbeAc+.

Para demostrar la importancia de la presencia de HbeAg,



hemos convertido en CI a cualquier PC que presentase HbeAg; es decir, hemos comparado el nivel de infección de familias con algún miembro HbeAg+ frente a las que ninguno lo era, y en este caso las diferencias si alcanzan el nivel de significación estadística (ver tablas XXI y XXII, página 72). Por lo tanto aquellas unidades familiares con algún miembro HbeAg+ presentan un mayor riesgo de infección por el VHB.

#### **6.- Agregación familiar**

Una constante de los estudios de difusión intrafamiliar del VHB es la marcada tendencia a la agregación familiar. En el nuestro ocurre lo mismo, ya que todos los familiares infectados se agrupaban en el 50% de las familias estudiadas, y mas del 60% de los nuevos PC encontrados en tan solo 22 unidades familiares. Este último dato sugiere fuertemente una influencia genética en el desarrollo del estado de PC como se ha propuesto en diferentes ocasiones, por lo que nos proponemos estudiarlo en un futuro cercano.

#### **7.- Infección por VHD**

El único punto a resaltar es el confirmar que en nuestro país no presenta gran importancia la infección por este virus, estando prácticamente confinada en los UDVP.

## **B. Estudio de familiares con marcadores atípicos**

### **1.- Familiares con HbcAc aislado (HbsAg- HbcAc+ HbsAc-)**

Como ya se ha expuesto este perfil serológico es muy frecuente en ADVP, mientras que en población normal no suele superar el 5%. En nuestro estudio ocurre esto último, pero es relativamente frecuente que aparezca este perfil en la práctica clínica, siendo en ocasiones de difícil interpretación. Aunque en un principio no se recomendaba la vacunación de estos pacientes, hoy en día se suele tender a vacunarlos y en ocasiones se realiza estudio de HbsAg y HbsAc obviando este marcador. En nuestra experiencia un tercio de los individuos con este perfil manifestaron una reacción anamnésica con una sola dosis de vacuna por lo que obviamente estos casos son verdaderos positivos de HbcAc, y un 96.4% de ellos mantuvieron la reactividad al ser tratados con MBS. Por el contrario de los que requirieron tres dosis de vacuna para obtener respuesta, hecho que sugiere fuertemente un resultado falsamente positivo, solo un 18.7% fueron reactivos con MBS. Teniendo en cuenta que este agente reductor no afectó significativamente a la reactividad de 80 sueros HbcAc+ así como a la de 30 HbcAc- ya conocidos, consideramos que puede llegar a ser un ensayo confirmatorio de la reactividad del HbcAc, ya que puede eliminar hasta un 80% de los resultados falsamente positivos. Según lo expuesto podemos estimar que el ensayo con MBS consigue un aumento de especificidad manteniendo una gran sensibilidad.

En cuanto a los individuos que no respondieron a la vacuna, 2 fueron negativos por el ensayo con MBS y 12 mantuvieron la reactividad. Aunque no es posible etiquetar a estos pacientes como verdaderos o falsos positivos, podemos especular que los dos primeros fueran no respondedores a la vacuna y los otros 12 pensamos que podía tratarse de portadores silentes del virus, pero en ninguna ocasión se consiguió amplificar el ADN del virus. Las posibles explicaciones a estos hechos son tres:

I.- Falsa reactividad del ensayo HbcAc convencional y con MBS unido a falta de respuesta a la vacuna

II.- Portadores silentes sin ADN viral en suero

III.- Infección pasada en individuos con alguna alteración inmunológica que no permite alcanzar niveles de HbsAc detectables

Es probable que haya casos que se puedan adscribir a los distintos apartados expuestos. Merece la pena destacar que en ADVP anti-VIH negativo tras una hepatitis aguda por el VHB frecuentemente se obtiene este perfil en el posterior seguimiento, lo que implica los puntos II o III. Es posible que en un futuro cercano obtengamos respuesta a los interrogantes que plantean este tipo de individuos.

## 2.- Vacunación natural (HBSAc aislado)

Hemos encontrado en un 2.1% de familiares HbcAc- estudiados el perfil serológico de HbsAc aislado, y que por tanto no requerirían vacunación. Aunque 3 de los casos fueron mujeres, el bajo número encontrado no permite comparación, por lo que no podemos corroborar la observación de que este perfil serológico es mas frecuente en mujeres debido a la transmisión sexual, al

existir mas frecuentemente en semen partículas virales incompletas. Por el contrario el encontrar un caso en un hijo de un CI de 14 años de edad si puede apoyar la hipótesis de que la transmisión horizontal puede estar vehiculizada por la saliva, en donde la presencia de partículas virales incompletas es mas frecuente que en la sangre y cuyo contacto con otros miembros de la unidad familiar puede ser frecuente (en el caso descrito el individuo tenía un hermano PC). En cualquier caso el coste/beneficio de este estudio no es rentable ya que es mas económico el vacunar a todos los familiares HbcAc- sin realizar ningún estudio serológico adicional, ya que de 187 individuos estudiados solo se hubiera evitado vacunar a 4.

## C.- Resultados del programa de vacunación

### 1.- Aceptación y tasas de respuesta

Los resultados obtenidos se pueden considerar muy satisfactorios al haber conseguido un cumplimiento total del protocolo en mas del 90% de la población diana, y una cifra cercana al 95% en cuanto a los individuos que recibieron una pauta correcta de vacunación. Cabe destacar que estas cifra no se hubieran conseguido sin el tesón y la dedicación del personal del Servicio de Microbiología encargado del programa de vacunación de los Centros de Salud de Leganés (Pedroches) y Fuenlabrada (El Arroyo), que en numerosas ocasiones hubo de recurrir al correo o al teléfono para conseguirlo. Además podemos considerar este programa como un éxito en cuanto a la colaboración de dos entidades oficiales que son la Consejería de Sanidad de la CAM y el Insalud; el primero de ellos al promover el programa suministrando las vacunas, al detectar el bajo número de individuos de este Area Sanitaria que acudían a vacunarse al Centro de Vacunación de Madrid (Buen Suceso), y el segundo al articular los medios y llevar a cabo el programa.

En cuanto a los datos sobre respuesta a la vacuna son los habituales, con altas tasas de seroconversión cifrándose la tasa global de respuesta en un 96%, siendo los grupos de mejor respuesta los que presentan una menor edad media.

## 2.- Amplitud de los estudios de familiares

Cuando se detecta un individuo HbsAg+ se suele recomendar el estudio de familiares o personas que convivan con él. En nuestra experiencia por cada CI detectado se ha generado el estudio de 3.3 nuevos individuos de media. Frecuentemente ocurre que muchos familiares no residen en la misma localidad, y en otras ocasiones el paciente refiere múltiples contactos con parientes o personas cercanas relacionadas, por lo que se suele plantear el problema de hasta donde realizar el estudio. Lo mas frecuente es estudiar a los que convivan con él y a algún familiar si es que reside en el mismo Area de Salud.

Hemos demostrado que en individuos jóvenes HbsAg+ sin otros factores de riesgo para la infección (UDVP..), las probabilidades de que la infección provenga de la madre son muy altas. Por lo tanto hace que sea imprescindible el estudio de la misma aunque no conviva en ese momento con él. Si la madre resultara ser HbsAg+, se ampliará el estudio al resto de la familia. Esto también será aplicable para mujeres HbsAg+ que hayan tenido hijos previamente y no convivan con ellos o en aquellas ocasiones en que se detecte algún hermano que también sea HbsAg+. En estas situaciones pensamos que el estudio de familiares no se ha de limitar a los convivientes o cercanos del CI y se articularán métodos para el estudio de los mismos en la localidad donde residan, dada la marcada agregación de PC del virus.

En cuanto a aspectos inminentemente prácticos, queremos aconsejar para este tipo de programas el articular sistemas de recuerdo o aviso a los pacientes (cita telefónica principalmente o en su defecto el correo) para que acudan a la vacunación o

posterior control, dada la fragilidad de la mente humana cuando no se está enfermo, y cuya puesta en práctica ha sido una de las claves del éxito de este programa.

## CONCLUSIONES

### A. Aspectos epidemiológicos

1. A partir de un total de 449 CI HbsAg+ hemos estudiado serológicamente a 1475 familiares, resultando un 7% HbsAg+ y un 30.7% HbcAc+, lo que implica haber encontrado 103 nuevos individuos que también eran HbsAg+.

2. Las prevalencias y la tasa de cronicidad de los principales grupos de familiares estudiados en orden decreciente fue la siguiente:

Hermanos	16.7% HbsAg+, 46.4% HbcAc+, TC 36.2%
Madres	14.4% HbsAg+, 56 % HbcAc+, TC 25.7%
Hijos	5.9% HbsAg+, 15.4% HbcAc+, TC 32.5%
Padres	4.7% HbsAg+, 52.8% HbcAc+, TC 8.9%
Cónyuges	2.8% HbsAg+, 34.8% HbcAc+, TC 8.1%

3. Las mayores TC las presentaron los grupos de menor edad, hermanos e hijos, lo que solo se justificaría en base a que la infección se produjera por vía vertical o en los primeros años de vida. Esto además se apoya en los datos obtenidos al estudiar a las madres de estos dos grupos:

- El 88% de los hijos HbsAg+ encontrados presentaban una madre que también era HbsAg+

- El 30% de los hermanos HbsAg+ encontrados en los que se pudo estudiar a la madre también era HbsAg+

4. Los 103 nuevos PC encontrados se localizaron en tan solo



65 unidades familiares (14% del total de familias estudiadas), lo que sugiere además una influencia genética en el desarrollo del estado de portador.

5. La existencia de un PC HbeAg+ en una unidad familiar aumenta el riesgo de infección intrafamiliar.

6. El subtipado del virus es un instrumento epidemiológico de gran valor que nos ha permitido corroborar la importancia de la transmisión intrafamiliar. Así, de 30 unidades familiares estudiadas con mas de un PC, en 29 de ellas (96%) todos los individuos HbsAg+ presentaban el mismo subtipo viral, teniendo en cuenta que en el cómputo global un 63% se adscribieron al subtipo ay mientras que un 37% lo hicieron al ad.

## **B. Aspectos diagnósticos sobre perfiles atípicos**

1. Hemos encontrado el perfil serológico de HbcAc aislado en un 4% de los familiares estudiados. De estos un 32.7% respondió de forma anamnésica a la administración de una dosis de vacuna, mientras que un 43.1% requirió tres dosis de vacuna para detectarse HbsAc, no ocurriendo esto en el 24.1% restante.

2. En ninguno de los grupos expuestos en el punto anterior se detectó ADN-VHB en suero mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa.

3. El ensayo HbcAc con MBS se evaluó respecto a grupos control y a los individuos HbcAc aislado que respondieron a una dosis de vacuna con los siguientes resultados:

97% de sensibilidad, 100% de especificidad, 100% de valor predictivo positivo y 90% de valor predictivo negativo.

4. El ensayo HbcAc con MBS confirmó la reactividad en el 94% de los individuos con HbcAc aislado que respondieron con una dosis de vacuna mientras que solo fueron reactivos un 40% de los sueros de individuos que respondieron con tres dosis de vacuna, lo que reafirma que puede ser un ensayo de confirmación de HbcAc en perfiles atípicos o resultados dudosos.

5. Hemos obtenido el perfil serológico de HbsAc aislado en ausencia de vacunación previa en un 2.1% de la población estudiada, por lo que creemos que es bastante poco frecuente.

### **C. Programa de vacunación (Recomendaciones prácticas)**

1. Recomendamos el estudio serológico previo a la vacunación en familiares de individuos HbsAg+ mediante ensayo HbcAc, debido a las altas tasas de infección que presentan.

2. Se vacunará a aquellos que resulten HbcAc negativo y a los que presentan HbcAc aislado, ya que en este último grupo puede haber falsas reactividades y en nuestra experiencia, hasta un 75% de ellos va a responder a la vacuna.

3. En caso de detectarse un nuevo individuo HbsAg+ en una unidad familiar aconsejamos no limitar el estudio a los convivientes actuales del CI, sino además articular un sistema de estudio del resto de los familiares de primer grado aunque no residan en la misma Comunidad.

4. Por último, también recomendamos el empleo de algún método de aviso o recuerdo para acudir a la administración de las sucesivas dosis de vacuna, lo que ha conseguido en nuestro trabajo alcanzar tasas de cobertura vacunal del 96%.

**BIBLIOGRAFIA**

- 1.- Lurman A. Eine icterus epidemic. Berl Klin Wochensche 1855; 22:20.
- 2.- Flaum A., Malmros H., Persson E. Eine nosocomiale icterus epidemic. Acta Med Scand 1926: 544.
- 3.- Bigger J.W., Dubi S.D. Jaundice in syphilitics under treatment. Lancet 1943; 1:457.
- 4.- Mac Callum F.O. Transmission of arsenotherapy jaundice by blood: Failure with feces and nasopharyngeal washings. Lancet 1945; 1:242.
- 5.- Mc Natly A.S. Great Britain Ministry health Report of Chief Medical Officer Annual Report. London, 1937.
- 6.- Propert S.A. Hepatitis after prophylactic serum. Br Med J 1938; 2:677.
- 7.- Beeson P.B., Chesney O., Mc Farlan A.M. Hepatitis following injection of mumps convalescent plasma. Lancet 1944; 1:814.
- 8.- Jaundice following yellow fever vaccine. JAMA 1942; 119:1110.
- 9.- Findlay G.M., Mac Callum F.O. Note on acute hepatitis and yellow fever immunization. Trans Soc Trop Med Hyg 1937; 31:297.
- 10.- Morgan H.W. Jaundice following administration of human blood products. Br Med J 1943; 1:297.
- 11.- Beeson P.B. Jaundice occurring one to four months after transfusion of blood or plasma. JAMA 1943; 121:1332.
- 12.- Neefe J.R., Gellis S.S., Stokes J. Homologous serum hepatitis and infectious hepatitis: Studies in volunteers bearing on immunological and other characteristics of the etiological and immunological types of infection. JAMA 1967; 203:365.
- 13.- Paul R.J., Havens W.P., Sabin A.B. Transmission experiments in serum jaundice. Proc Soc Exp Biol Med 1945; 59:148.
- 14.- Havens W.P. Experiment in cross immunity between infections and homologous serum jaundice. Proc Soc Exp Biol Med 1945; 59:148.

15.- Krugman S., Giles J.P., Hammond J. Infectious hepatitis: Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. JAMA 1967; 200:365.

16.- Neefe J.R., Stokes J., Gellis S. Homologous serum hepatitis and infectious hepatitis. Experimental study of immunity and cross immunity in volunteers. Am J Med Sci 1945; 210:561.

17.- Krugman S., Giles J.P. Viral hepatitis: New light on an old disease. JAMA 1970; 212:1019.

18.- Neefe J.R., Stokes J. Oral administration to volunteers of feces from patients with homologous serum hepatitis and infectious hepatitis. Am J Med Sci 1945; 210:29.

19.- Blumberg B.S., Alter S.J., Visnich S. A "new" antigen in leukemia sera. JAMA 1965; 191:541.

20.- Blumberg B.S., Gertsley J.S., Huntgerford D.A. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome leukemia and hepatitis. Ann Intern Med 1967; 66:924.

21.- Okachi K., Murakami S. Observations on Australian antigen in Japanese. Vox Sang 1968; 15:374.

22.- Prince A.M. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc Natl Acad Sci USA 1968; 60:814.

23.- Smuzness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: Evidence for a casual association. Proc Med Virol 1978; 24:40.

24.- Robinson W.S. Genetic variation among hepatitis B and related virus. Ann NY Acad Sci 1980; 354: 371-8.

25.- Robinson W.S., Marion P.L., Feitelson M, et al. The hepadnavirus group: Hepatitis B and related viruses. In: Smuzness W., Alter H.J. Viral Hepatitis. Philadelphia: Franklin Institute Press; 1982:57-68.

26.- Summers J., Smolec J.M., Snyder R. Avirus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75:4533-7.

27.- Marion P.L., Oshiro L., Regnery D.C. et al. A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of man. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:2941-5.

28.- Mason W.S., Seal G., Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. J Virol 1980; 36:829-836.

29.- Gust I.D., Burnell C.J., Coulepis A.G. Taxonomic classification of hepatitis B virus. Intervirology 1986; 25:14-29.

- 30.- Bayer M.E., Blumberg B.S., Werner B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature* 1968; 218: 1057-9.
- 31.- Dane D.S., Cameron C.H., Briggs M. Virus-like particles in serum with Australia antigen associated. *Lancet* 1970; 2:695-8.
- 32.- Almeida J.D., Rubenstein D., Stott E.J. New antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis. *Lancet* 1971; 2:1225-7.
- 33.- Robinson W.S., Clayton D.A., Greenman R.L. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1975; 14:384-391.
- 34.- Kaplan P.M., Greenman R.L., Gerin J.L., et al. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol* 1973; 12:995-1005.
- 35.- Robinson W.S., Greenman R.L. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol* 1974; 13:1231-6.
- 36.- Takahashi K., Akahane Y., Gotanda T., et al. Demonstration of hepatitis e antigen in the core of Dane particle. *J Immunol* 1979; 122:275-9.
- 37.- Redeker A.G., Hopkins C.E., Jackson B., et al. A controlled study of the safety of pooled plasma stored in the liquid state of 30-32°C for 6 months. *Transfusion* 1968; 8:60.
- 38.- Murray R., Die Fenbach W.C. Effect of heat on the agent of homologous serum hepatitis. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953; 84:230.
- 39.- Krugman S., Giles J.P., Hammond J. Hepatitis virus: Effect of heat infectivity and antigenicity of MS1 and MS2 strains. *J Infect Dis* 1970; 122:432-6.
- 40.- Salaman M.H., Williams D.I., King A.J., et al. Prevention of jaundice resulting from antisyphilitic treatment. *Lancet* 1944; 2:7-8.
- 41.- Barker L.F., Murray F. Relationship of virus dose to incubation time of clinical hepatitis and time of appearance of hepatitis-associated antigen. *Am J Med Sci* 1972; 263:27.
- 42.- Scullard G., Greenberg H.B., Smith J.L., et al. Antiviral treatment of hepatitis B chronic infection: Infectious virus cannot be detected in patient serum after permanent responses to treatment. *Hepatology* 1982; 2:39.
- 43.- Shikata T., Karasawa T., Abe K., et al. Hepatitis e antigens and infectivity of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1977; 136:571.
- 44.- Kim C.Y., Tilles G.J. Purification and biophysical

characterization of hepatitis B antigen. *J Clin Invest* 1970; 52:1176.

45.- Le Bouvier G.L. The heterogeneity of Australian antigen. *J Infect Dis* 1971; 123:671-5.

46.- Bancroft W.H., Mundo F.K., Russel P.K. Detection of additional determinants of hepatitis B antigen. *J Immunol* 1972; 109:842-8.

47.- Courouce-Pauty A.M., Soulier J.P. Further data on HBs antigen subtypes-geographical distribution. *Vox Sang* 1974; 27:533-549.

48.- Courouce A.M., Holland P.V., Muller J.Y., et al. HBsAg subtypes. Proceedings of the International Workshop on HBs subtypes. *Bibl Haematol* 1976; 42:1-158.

50.- Heerman K.H., Goldman U., Schwartz, et al. *J Virol* 1984; 52:396.

51.- Thornton G.B., Moriarty A.M., Milich D., et al. Protection of chimpanzees from hepatitis B infection after immunization with synthetic peptides. Cold Spring Harbor Vaccine Meeting 1988.

52.- Hruska J.F., Robinson W.S. The proteins of hepatitis B Dane particle cores. *J Med Virol* 1977; 1:119-131.

53.- Budkowska A., hih J.W.K., Gerin J.L. Immunochemistry and polypeptide composition of hepatitis B core antigen. *J Immunol* 1977; 118:1300-50.

54.- Bonino F., Crivelli o., Rizzetto, M. Progress in hepatitis research: hepatitis B virus and hepatitis D virus. Sorin Biomedica S.p.a.

55.- Summers J.A., O'Connell A., Millman I. Genome of hepatitis B virus: Restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 4597-4601.

56.- Hruska J.F., Clayton D.A., Rubenstein J.L., et al. Structure of hepatitis B Dane particle DNA before and after the Dane particle DNA polymerase reaction. *J Virol* 1972; 21: 666-72.

57.- Gehrlich W., Robinson W.S. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand. *Cell* 1980; 21:801.

58.- Molnar K., Summers J., Taylor J., et al. Protein covalently bound to minus strand DNA intermediates of duck hepatitis B virus. *J Virol* 1983; 45:165.

59.- Galibert F., Mandart E., Fitoussi F., et al. Nucleotide sequence of hepatitis B virus (subtype ayw) cloned in *E.coli*.

Nature 1979; 281: 646-50.

60.- Miller R., Robinson W.S. Common evolutionary origin of hepatitis B virus and retroviruses. Proc Natl Acad Sci USA 1986; 23:2531-5.

61.- Kam W., Rall M., Smuckler E., et al. Hepatitis B viral DNA in liver and serum of asymptomatic carriers. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79:7522-6.

62.- Magnus L.O., Espmark J.A. New specificities in Australia antigen-positive sera distinct from Le Bouvier determinants. J Immunol 1972; 109: 1017-21.

63.- Magnus L.O. Characterization of a new antigen-antibody system associated with hepatitis B. In Exp Immunol 1975; 20:209-16.

64.- Takahasi K., Akahane Y., Gotanda T., et al. Demonstration of hepatitis e antigen in the core of Dane particles. J Immunol 1979; 122:275-9.

65.- Takahasi K., Imai M., Tsuda F., et al. Association of Dane particles with e antigen in the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. J Immunol 1976; 117:102-5.

66.- Nowoslawski A., Krackczyouski K., Brzosko W.J. Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. Am J Pathol 1972; 68:31-48.

67.- Karasawa T., Tsukagoshi S., Yoshimura M., et al. Light microscopic localization of hepatitis B antigens in the human pancreas: Possibility of multiplication of hepatitis B virus in the human pancreas. Gastroenterology 1981; 81:898-1005.

68.- Romet-Lemonne J.L., Mc Lane M.F., Elfassi E., et al. Hepatitis B infection in cultured human lymphoblastoid cells. Science 1983; 221:667.

69.- Johnson P.J., Wansbrough-Jones M.H., Portmann B. Familial HBsAg positive hepatoma: Treatment with orthopic liver transplantation and specific immunoglobulin. Br Med J 1978; 1:216.

70.- Blumberg B.S., Friedlander J.S., Woodside A., et al. Hepatitis and Australia antigen: autosomal recessive inheritance of susceptibility to infection in humans. Proc Natl Sci USA 1969; 62:1108.

71.- Grosman R.A., Benenson M.W., Scott R.M., et al. An epidemiologic study of hepatitis B virus in Bangkok, Thailand. Am J Epidemiol 1975; 101: 144.

72.- Hillis W.D., Hillis A., Bias W., et al. Association of hepatitis B surface antigenemia with HLA locus B specificities. N

Engl J Med 296:1310.

73.- Stevens E.C., Beasley R.P. Lack of an autosomal recessive genetic influence in the vertical transmission of hepatitis B antigen. *Nature* 1976; 260:715.

74.- Paterson M.J., Hourani M.R., Mayor G.H., et al. HLA antigens and hepatitis B virus. *N Engl J Med* 1977; 297:1124.

75.- Smuzness W., Stevens C.E., Ikram H., et al. Prevalence of hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma in Chinese-Americans. *J Infect Dis* 1978; 137:822.

76.- London W.T., Drew J.S., Ludbader D.E., et al. Host response to hepatitis B infection in patients in a chronic hemodialysis unit. *Kidney Int* 1977; 12:51.

77.- Blumberg B.S. Australia antigen: The history of its discovery with comments on genetic and family aspects. In: Vyas G.N., Perkins H.A., Schmidt R., eds. *Hepatitis and blood transfusion*. New York: Grune and Stratton; 1972: 63.

78.- Blumberg B.S., Sutnick A.I., London W.T., et al. Sex distribution of Australia antigen. *Arch Intern Med* 1972; 130:231.

79.-Schweitzer J.L., Dunn A.E., Peters R.L., et al. Viral hepatitis in neonates and infants. *Am J Med* 1973; 55:762.

80.- Enfermedades de Declaración Obligatoria. Subdirección General de Información Sanitaria y Epidemiología. Ministerio de Sanidad y Consumo.

81.- Consejería de Salud de la CAM. Plan regional de actuación frente a la hepatitis B y la hepatitis delta. Ed. CAM 1989.

82.- Recomendaciones y estrategias frente al hepatitis B y la hepatitis Delta. Consejería de Salud y Bienestar Social. Ed. CAM.

83.- Center for Disease Control. Inactivated virus B vaccine. *Mofb Mort Weekly Rep* 1982; 31:318.

84.- Smuzness W., Harley E.J., Ikran H., et al. Sociodemographic aspects of the epidemiology of hepatitis B. In: Vyas G.N., Cohn S.N., Schimd R., eds. *Viral Hepatitis: A Contemporary Assesment of Etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention*. Philadelphia: Franklin Institute Press, 1978:297.

85.- Holland P.V. Available methods to further reduce post-transfusion hepatitis. In: Smuzness W., Alter H.J., Maynard H.J. eds. *Viral Hepatitis: 1981 International Symposium*. Philadelphia: Franklin Institute Press; 1982: 563.

86.- Knodell R.G., Conrad M.E., Dienstag J.L., et al.



Etiological spectrum of posttransfusion hepatitis.  
Gastroenterology 1975; 69:1278.

87.- Encuesta Seroepidemiológica en la Comunidad de Madrid.  
Consejería de Salud. Ed.CAM 1989.

88.- Tong M.J., Thursby M., Rakela J., et al. Study of the  
maternal-infant transmission of the viruses which cause acute  
hepatitis. Gastroenterology 1981; 80:999.

89.- Colgrove R., Simon G., Ganem D. Transcriptional  
activation of homologous and heterologous genes by the hepatitis  
B virus X gene product in cells permissive for viral replication.  
J Virol 1989; 63:4019-4026.

90.- Spandau D.F., Lee C.H. Trans-Activation of viral  
enhancers by the hepatitis B virus X protein. J Virol 1988;  
62:427-434.

91.- Levrero M., Stemler M., Pasquinelli S., et al.  
Significance of Anti-HBx antibodies in hepatitis B virus  
infection. Hepatology 1991; 13:143-149.

92.- Wang W., London T., Lega L., Feitelson A. HBxAg in the  
liver from patients with chronic hepatitis and cirrhosis.  
Hepatology 1991; 14:29-37.

93.- Wollersheim M., Debelka U., Hofschneider P.H. A trans-  
activating function encoded in the hepatitis B virus X gene is  
conserved in the integrated state. Oncogene 1988; 3:545-552.

94.- Franco A., Paroli M., Testa U., et al. Transferrin  
receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope  
antigen by T lymphocytes. J Exp Med 1992; 175:1195-1205.

95.- Malter J., Gerber M. The polymerase chain reaction for  
hepatitis B virus DNA. Hepatology 1991; 13: 188-190.

96.- Gerber M. The pre-S2 region of Hepatitis B virus: More  
questions than answers. Hepatology 1989; 9:328-330.

97.- Theilmann L., Klinker M., Gmelin K., et al. Detection  
of pre-S1 proteins in serum and liver of HBsAg positive patients:  
a new marker for hepatitis B virus infection. Hepatology 1986;  
6:186-190.

98.- Thung S.N., Gerber M.A., Kasambalides E.J., et al.  
Demonstration of pre-S polypeptides of Hepatitis B virus infected  
livers. Hepatology 1986; 6:1315-1318.

99.- Kurai K., Iino S., Koike K., et al. Serum titers of  
Pre-S2 antigen in patients with acute and chronic type B  
hepatitis: relation to serum aminotransferase activity and other  
hepatitis B virus markers. Hepatology 1989; 9:175-179.

- 100.- Campillo M., Quiroga A., Bartolomé J., et al. Protein composition of the hepatitis B virus e antigen in the natural course of disease and following interferon therapy. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1256-1261.
- 101.- Zoulim F., Mimms L., Floreani M., et al. New assays for quantitative determination of viral markers in management of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Microbiol* 1992; 30:1111-1119.
- 102.- Carman W.F., Jacyna M.R., Hadziyannis S., et al. Mutation preventing formation of e antigen in patients with chronic HBV infection. *Lancet* 1989; 2:588-591.
- 103.- Carman W.F., Fagan E., Hadziyannis S., et al. Association of a precore genomic variant of hepatitis B virus with fulminant hepatitis. *Hepatology* 1991; 14:219-222.
- 104.- Krugman S.L., Overby L.R., Mushahwar I.K., et al. Viral hepatitis type B: Studies on natural history and prevention reexamined. *N Engl J Med* 1979; 300:101-106.
- 105.- Hoofnagle J.H., Seef L.B., Bales Z.B., et al. Serologic responses in hepatitis B. In: Vyas G.N., Cohen S.N., Schmidt T., eds. *Viral Hepatitis: A contemporary assessment of Etiology, Epidemiology, Pathogenesis and Prevention*. Philadelphia: Franklin Institute Press; 1978:219-242.
- 106.- Shulman R.N. Hepatitis-associated antigen. *Am J Med* 1971; 49:669-692.
- 107.- Fields H.A., Bradley D.W., Davis C., et al. Radioimmunoassay for the detection of hepatitis e antigen and its antibody. *J Immunol* 1978; 121:273.
- 108.- Ling C., Mushahwar I.K., Overby L.R., et al. Hepatitis e antigen and its correlation with other serologic markers in chimpanzees. *Inf Immun* 1979; 24:352-356.
- 109.- Kaplan P.N., Gerin J.L., Alter H.J., et al. Hepatitis B-specific DNA polymerase activity during post-transfusion hepatitis. *Nature* 1974; 249:762.
- 110.- Krugman S., Hoofnagle J.H., Gerety R.J., et al. Viral hepatitis type B: DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med* 1974; 290:1331-1335.
- 111.- Gocke D.J. Extrahepatic manifestations of viral hepatitis. *Am J Med Sci* 1975; 270:49-52.
- 112.- Smuzness W., Prince A.M., Brotman B. Hepatitis B e antigen and antibody in blood donors: An epidemiologic study. *J Infect Dis* 1973; 127:17.
- 113.- Helske T. Carriers of hepatitis B antigen and transfusion hepatitis in Finland. *Scand J Haematol* 1974; 22:1.

- 114.- Sampliner R.E., Hamilton F.A., Iseri O.A. The liver histology and frequency of clearance of the hepatitis B surface antigen in chronic carriers. *Am J Med Sci* 1979; 277:17.
- 115.- Liaw Y.F., Sheen I., Chen T. Incidence, determinants and significance of delayed clearance of serum HBsAg in chronic hepatitis B virus infection. *epatology* 1991; 13:627-631.
- 116.- Bories P., Coursaget P., Degott C., et al. Antibody to hepatitis B core antigen in chronic active hepatitis. *Br Med J* 1978; 1:396-397.
- 117.- Barker L.F., Maynard J.E., Purcell R.H., et al. Hepatitis B infection in chimpanzees: Titration of subtypes. *J Infect Dis* 1975; 132:451.
- 118.- Koziol D.E., Alter H.J., Irchner J.P. Development of HBsAg positive hepatitis despite previous existence of antibody to HBsAg. *J Immunol* 1976; 117:2260.
- 119.- Sherert R.J., Spindel E., Hoofnagle J.H. Antibody to hepatitis B surface antigen may not always indicate immunity to hepatitis B virus infection. *N Eng J Med* 1983; 309:1519.
- 120.- Linnemann C.C., Askey P.A., Susceptibility to hepatitis B despite high titer anti-HBs antibody. *Lancet* 1984; 1:346.
- 121.- Tabor G., Gerety R.J. Possible role of immune response to hepatitis B core antigen in protection against hepatitis B infection. *Lancet* 1984; 1:172.
- 122.- Lee S., Lo K., Tsai Y., et al. HBsAg carrier infants with serum anti-HBc negativity. *Hepatology* 1989; 9:102-104.
- 123.- Möller B., Hopf U., Stemerowicz R., et al. HBcAg expressed on the surface of circulating Dane particles in patients with hepatitis B virus infection without evidence of anti-HBc formation. *Hepatology* 1989; 10:179-185.
- 124.- Prince A.M. Mechanism of protection against hepatitis B infection by immunization with hepatitis B cores. *Lancet* 1984; 1:512.
- 125.- Saiki R., Scharf S., Faloona F., et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230:1350-4.
- 126.- Harrison T.J., Zuckerman A.J. Variants of hepatitis B virus. *Vox Sang* 1992; 63:161-7.
- 127.- Gutiérrez M., do Barrio A., Zorraquino A., et al. Variantes del virus de la hepatitis B: Perfiles serológicos atípicos. *Química Clínica* 1994; 13:1-5.

128.- Kaneko S., Miller R.H., Feinstone S.M., et al. Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the PCR assay. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86:312-6.

129.- Malter J.S., Gerber M.A. The polymerase chain reaction for hepatitis B virus DNA. Hepatology 1991; 13:188-190.

130.- Baginski I., Chemin I., Hantz O., et al. Transmission of serologically silent hepatitis B virus along with hepatitis C virus in two cases of posttransfusion hepatitis. Transfusion 1992; 32:215-220.

131.- Gerken G., Paterlini P., Manns M., et al. Assay of hepatitis B virus DNA by PCR and its relationship to preS- and S-encoded viral surface antigens. Hepatology 1991; 13:158-166.

132.- Shindo M., Okuno T., Arai K., et al. Detection of HBV DNA in liver tissues in chronic hepatitis B or non-A, non-B using PCR. Hepatology 1991; 13:167-171.

133.- Erhlich H.A. Polimerase chain reaction. J Clin Immunol 1989; 9: 437-446.

134.- Budkowska A., Dubreuil P., Poynard T., et al. Anti-pre S responses and viral clearance in chronic hepatitis B infection. Hepatology 1992; 15:26-31.

135.- Zaaier H.L., ter-Borg F., Cuyppers H.T., et al. Comparison of methods for detection of HBV DNA. J Clin Microbiol 1994; 32:2088-91.

136.- Edgington T.S., Chisari F.V. Immunological aspects of hepatitis B infection. Am J Med Sci 1975; 270:213-27.

137.- Peters R.L. Viral hepatitis: A pathologic spectrum. Am J Med Sci 1975; 270: 17.

138.- Hruska J.F., Robinson W.F. The proteins of hepatitis B Dane particle cores. J Med Virol 1977;1: 119-131.

139.- Barker L.F., Murray R. Relationship of virus dose to incubation time of clinical hepatitis and time of appearance of hepatitis-associated antigen. Am J Med Sci 1972;263:27.

140.- Schweitzer I.L., Dunn A.E.F., Peters R.L., et al. Viral hepatitis in neonates and infants. Am J Med 1973;55:762.

141.- London W.T., di Figlia M., Sutnick A.I., et al. An epidemic of hepatitis in a chronic haemodialysis unit. N Eng J Med 1969; 281:571-8.

142.- Good R.A., Page A.R. Fatal complications of virus hepatitis in two patients with agammaglobulinemia. Am J Med 1960; 29:804.

143.- Smuzness W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: Evidence of causal association. *Proc Med Virol* 1978;24:40.

144.- Feitelson M. Hepatitis B virus infection and primary hepatocellular carcinoma. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 275-301.

145.- Caspari G., Beyer H.J., Elbert G., et al. Unsatisfactory specificities and sensitivities of six enzyme immunoassays for antibodies to hepatitis B core antigen. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2067-72.

146.- Blum H., Liang T.J., Galun E., Wands J.R. Persistence of HBV DNA after serological recovery from HBV infection. *Hepatology* 1991; 14:56-62.

147.- Luo KX., Wang L.P., Nie J., Jiang S. Is Nonresponsiveness to hepatitis B vaccine due to latent hepatitis B virus infection? *J Infect Dis* 1992; 165:777-8.

148.- Luo Kx., Zhou R., He C., et al. Hepatitis B DNA in sera of virus carriers positive exclusively for antibodies to the hepatitis B core antigen. *J Med Virol* 1991; 35:55-9.

149.- Jáuregui J.I., Civeira M.P., Serrano M., et al. Detección del DNA del virus de la hepatitis B en suero mediante amplificación génica en pacientes con hepatitis crónica B y en pacientes con hepatitis crónica C. *Med Clin* 1992; 98:49-52.

150.- Smuzness W., Prince A.M., Hirsh R.L., Brotman B. Familial clustering of hepatitis B infection. *N Eng J Med* 1973; 29:1162-6.

151.- Singleton J.W., Kobler P.F., Merril D.A. Infectivity risk of household contact with chronic carrier of hepatitis B antigen (HBsAg). *Gastroenterol* 1973; 64:172.

152.- Ricci G., De Bac C., Caramina F. Carriers of hepatitis B antigen and epidemiologic and histologic study. *J Infect Dis* 1973; 79:690-693.

153.- Heathcote J., Gateau P.H., Sherlock S. Role of hepatitis B antigen carriers in non parenteral transmission of the hepatitis B antigen. *Lancet* 1974; 2:370-1.

154.- Berris B., Wrobel V.M., Sinclair J.C., et al. Hepatitis B antigen in families of blood donors. *Ann Intern Med* 1973; 79:690-3.

155.- Irwin J.R., Allen A.W., Bancroft W.H. Hepatitis B antigen and antibody occurrence in families of asymptomatic HBsAg carriers. *JAMA* 1974; 227:1042-4.

156.- Smuzness W., Harley E.J., Prince A.M. Intrafamilial spread of asymptomatic hepatitis B. *Am J Med Sci* 1975; 270:293-

304.

157.- Helawell J.M., Woolf L.L., Jone D.J., Dymock E.W. Epidemiological observations on the families of hepatitis B antigen carriers and hepatitis B antibody positive individuals. Gut 1975; 16:402-6.

158.- Hadziyannis S.J. Non parenteral transmission of viral hepatitis in Greece. Am J Med Sci 1975; 270:313-6.

159.- Peters C.J., Purcell R.H., Lander, J.J., Johnson K.M. Radioimmunoassay for antibody to hepatitis B surface antigen shows transmission of hepatitis B virus among household contacts. J Infect Dis 1976; 134:218-223.

160.- Koff R.S., Slavin M.M., Conelly D., Rosen D.R. Contagiousness of acute hepatitis B. Secondary attack rates in household contacts. Gastroenterology 1977; 72:297-300.

161.- Tong M.G., Weiner J.M., Ashcavai M.W., et al. A comparative study of hepatitis B viral markers in the family members of Asian and non Asian patients with HBsAg positive hepatocellular carcinoma and with chronic hepatitis B infection. J Infect Dis 1979; 140:506-12.

162.- Perrillo R.P., Gelb L., Campbell C., et al. Hepatitis B antigen DNA polymerase activity and infection of household contacts with hepatitis B virus. Gastroenterology 1979; 76:1319-25.

163.- Eliakim M., Ligumsky M., Sandler S., Zlotnick A. Familiar clustering and immunoresponse in family contacts of patients with HBsAg positive liver cirrhosis. Am J Dis 1978; 23:407-12.

164.- Hess G., Born M., Dormeyer H., et al. Hepatitis B virus markers among family contacts of asymptomatic HBsAg carriers. Scand J Gastroent 1979; 14:373-8.

165.- Pastore G.P., Dentico G., Angarano V., et al. Infectivity markers in HBsAg chronic carriers and intrafamilial spread of hepatitis B infection. Hepatol Gastroenterol 1981; 28:20-22.

166.- Bernier R.H., Sampliner R., Gerety R.J., et al. Hepatitis B infection in household of chronic carriers of hepatitis B surface antigen. Am J epidemiol 1982; 116:199-221.

167.- Maggiore G., De Giacomo C., Marzani, M.D., et al. Role de l'enfant avec hepatite chronique dans la diffusion intrafamiliale de l'infection par le virus de l'hepatite B. Arch Fr Pediatr 1985; 42:683-685.

168.- Andreani T., Buffet C., Attali P., et al. Etude des marqueurs seriques du virus de l'hepatite B dans l'entourage familial des porteurs chroniques de l'antigen HBs. Gastroenterol

Clin Biol 1986; 10: 364-370.

169.- Lok A.S., Lai C.L., Wu P.C., et al. The transmission of hepatitis B virus in chinese. The role of vertical transmission and intrafamily spread. Hepatology 1984; 4:790.

170.- Bruguera M., Caballeria J., Acero D., et al. Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis B. Gastroenterol Hepatol 1980; 3:13-18.

171.- Arroba M.L., Ruiz M., Alvarez F., et al. Relación con el VHB en familiares de niños con hepatitis crónica. An Esp Pediatr 1983; 18:132.

172.- Garcia N., Ubalde E., Toledo M., et al. Profilaxis de la hepatitis B en el medio familiar. An Esp Pediatr 1983; 19: 190-1.

173.- Peña L., Infante D., Tormo R. Estudio de la infección por el virus de la hepatitis B en la infancia. An Esp Pediatr 1984; 24:134-5.

174.- Genesca J., Esteban J.L., Esteban R., et al. Difusión intrafamiliar del virus de la hepatitis B. Estudio de contactos familiares de portadores crónicos. Med Clin 1986; 87:271-4.

175.- Vélez M., Velarde A., Del Hierro J., et al. Infección por el VHB y vacunación en familiares de donantes de sangre en Navarra. Enf Infec y Microbiol Clin 1988; 6:9-14.

176.- González R., Serra M.A., Rodrigo, J.M., et al. Difusión intrafamiliar del VHB. Rev Clin Esp 1988; 182:127-133.

177.- Arístegui J., Pérez J., Cisterna R., et al. Características de la difusión intrafamiliar de la hepatitis B: Aportación casuística y revisión de la bibliografía. Enf Infec y Microbiol Clin 1989; 7:38-42.

178.- Carreño V., Porres J.C., Mora I., Hernández-Guió J.C. Epidemiological study of HBV risk infection in household contacts of HBsAg carriers, hospital personel and control groups. Hepatology 1983; 6:329-336.

179.- Bruguera M., Bosch J., Rodes J., Pedreira J. Familial clustering of hepatitis B antigen: a study in relatives of patients with liver diseases and hepatitis B antigenemia. Br Med J 1974; 3:495-497.

180.- Rota L., Díaz M.C., Molina M. Difusión del virus de la hepatitis B en familiares de niños con hepatitis crónica B. I Curso Internacional de Hepatología infantil sobre hepatitis por virus B en el niño. Madrid 1990.

181.- Delgado-I A., Cilleruelo M.L., Román E., Padilla B. Estudio serológico de contactos de madres HBsAg positivo. I Curso Internacional de Hepatología infantil sobre hepatitis

por virus B en el niño. Madrid 1990.

182.- Toukan A.U., Sharaia Z.K., Abu-el-Rub O.A., et al. The epidemiology of hepatitis B virus among family members in the Middle East. *Am J Epidemiol* 1990; 132:220-32.

183.- Pérez P., González V., Rodrigo L., et al. Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis B, un estudio prospectivo realizado en 103 familias. *Gastroenterol Hepatol* 1986; 9 Supl:44-45.

184.- Porres J.C., Carreño V., Bartolome J., et al. A dynamic study of the intrafamilial spread of hepatitis B virus. *J Med Virol* 1989; 28:237-42.

185.- Leichtner A.M., Leclair J., Goldmann D.A., et al. Horizontal nonparenteral spread of hepatitis B among children. *Ann Intern Med* 1981; 94:346-9.

186.- Saraux J.L., Buffet C., Etienne J.P. Prévalence des marqueurs du virus de l'hepatite B dans l'entourage des porteurs de l'antigène HBs. *Gastroenterol Clin Biol* 1985; 87:271-4.

187.- Lorient M.A., Marcellin P., Bismuth E., et al. Demonstration of HBV DNA by PCR in the serum and the liver after spontaneous or therapeutically induced HbeAg to anti-Hbe or HbsAg to anti-Hbs seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 1992; 15:32-36.

188.- Lazizi Y., Dubreuil P., Pillot J. Excess HbcAg in Hbc-antibody-negative chronic hepatitis B carriers. *Hepatology* 1993; 17:996-70.

189.- Hoofnagle J.H., Seeff L.B., Bales Z.B., et al. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Eng J Med* 1978; 298:1379-83.

190.- Centers for Disease Control. Department of Health and Human Services. Recommendations for protection against viral hepatitis. *Ann Intern Med* 1985; 103:391-402.

191.- Barin F., Perrin J., Chotard J., et al. Cross-sectional and longitudinal epidemiology of hepatitis B in Senegal. *Prog Med Virol* 1981; 27:148-62.

192.- Talbor E., Gederly R.J. Hepatitis B virus infection in infants and toddlers in Nigeria: the need for early intervention. *J Pediatr* 1979; 95:647-50.

193.- Prince A.M., White T., Pollack M., et al. Epidemiology of hepatitis B infection in Liberian infants. *Infect Immun* 1981; 32: 675-80.

194.- Stevens C.E., Beasley R.P., Tsui V., Lee W.C. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Eng J Med* 1975; 292: 771-4.



195.- Okada T., Yamada T., Miyakama Y., Mayumi M. Hepatitis B surface antigen in the serum of infants delivery from asymptomatic carrier mothers. *J Pediatr* 1975; 87:360-3.

196.- Villarejos V.M., Visona K.A., Gutierrez A., Rodriguez A. Role of the saliva, urine and feces in the transmission of hepatitis B. *N Engl J Med* 1974; 291:1375-8.

197.-Bancroft W.H., Snitbhan R., Scott R.N., et al. Transmission of hepatitis B to gnomons by exposure to human saliva containing hepatitis B surface antigen. *J Infect Dis* 1977; 135: 79-85.

198.- Alter H.J., Purcell R.H., Gerin J.L., et al. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by HBsAg positive saliva and semen. *Infect Immunol* 1977; 16:28-33.

199.- Petersen N.J., Barret D.H., Bond W.W., et al. HBsAg in saliva, impetigous lesions and the environment in two remote Alaskan villages. *Appl Environ Microbiol* 1976; 32: 572-4.

200.- Darami M., Gerber M. Hepatitis B antigen in vaginal secretions. *Lancet* 1974; 2:1008.

201.- Mazzur S. Menstrual blood as a vehicle of Australia antigen transmission. *Lancet* 1983; 1:749.

202.- Heathcote J., Cameron C.M., Dane C.S. Hepatitis B antigen in saliva and semen. *Lancet* 1974; 1:71.

203.- Alter H.J., Purcell R., Gerin J. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by HBsAg positive sera and semen. *Infect Immun* 1977; 16:928-33.

204.- Scott R.M., Snitbhan R., Bancroft W.H., et al. Experimental transmission of hepatitis B virus by semen and saliva. *J Infect Dis* 1980; 142:67-71.

205.- London W.T., Blumberg B.S. A cellular model of the role of hepatitis B virus in the pathogenesis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1982; 2:108-48.

206.- Carrasco D., Montoro J., Soler M.A., et al. ¿Desempeña algún papel el fenotipo HLA en la difusión familiar de la infección por el virus de la hepatitis B? *Gastroenterol Hepatol* 1983; 6:329-36.

207.- Encuesta Seroepidemiológica en la Comunidad de Madrid. Consejería de Salud. Ed.CAM 1995, Vol 4.

208.-Delgado-Iribarren,A., Guerra,L., Román,E., Padilla,B., Wilhelmi,I., Cañedo,T. Implicaciones de la detección de portadoras del VHB durante la gestación.I Reunion Nacional de Microbiologia en Atencion Primaria. Leganés, 1990.

- 209.- Carman W.F., Thomas H.C. Genetic variation in hepatitis B virus. *Gastroenterology* 1992; 102:711-19.
- 210.- Cuthbert J.A. Hepatitis B molecular variants with clinical significance? *Am J Med Sci* 1991; 302:396-403.
- 211.- Harrison T.J, Zuckerman A.J. Variants of hepatitis B virus. *Vox Sang* 1992; 63: 161-167.
- 212.- Brown J.L., Carman W.F., Thomas H.C. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 1992; 15:144-8.
- 213.- Carreño V. Últimos avances en hepatología. *Hepatología clínica* 1993; 149-161.
- 214.- Delgado-Iribarren A., Wilhelmi I., Padilla B., et al. Infección por VIH y por los virus de la hepatitis B, C y D en ADVP. Seroprevalencia de un año y su posterior seguimiento. *Enf Infec Microbiol Clin* 1993; 11:8-13.
- 215.- Sällberg M., Magnus L.O. EIA for HBc immunoglobulin G1 and significance of low-level results in competitive assays for anti-HBc. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 849-853.
- 216.- Hadler S.C., Murphy B.L., Schable C.A., et al. Epidemiological analysis of the significance of low-positive test results for antibody to hepatitis B surface and core antigen. *J Clin Microbiol* 1984; 19:521-525.
- 217.- Hanson M.R., Polesky H.F. Evaluation of routine anti-Hbc screening of volunteer blood donors: a questionable surrogate test for non-A, non-B hepatitis. *Transfusion* 1987; 27:107-108.
- 218.- Schmidt P.J., LeParc G.F., Samia C.T. Comparison of assays for anti-HBc in blood donors. *Transfusion* 1988; 28: 389-391.
- 219.- Weare J. A., Robertson G., Mansen G. Specificity and sensitivity of assays for antibody to hepatitis B core antigen. *Transfusion* 1989; 29: 43S.
- 220.- Weare J. A., Robertson G., Mansen G, et al. Improvement in the specificity of assays for detection of antibody to hepatitis B core antigen. *J. Clin Microbiol* 1991; 29: 600-604.
- 221.- Seto E.T., Yen T.S.B., Peterlim B.M., et al. Transactivation HIV long terminal repeat by the hepatitis B virus x-protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 8286-90.
- 222.- Twu S., Robinson W.S. Hepatitis B virus X gene can transactivate heterologous viral sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2046-50.

- 223.- Carman W., Zanetti A., Karayiannis P., et al. Vaccine escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990(ii):325-9.
- 224.- Zanetti A.R., Panzi E., Manzillo G., et al. Hepatitis B variant in Europe. *Lancet* 1988(ii): 1132.
- 225.- Mazzur S., Burget S., Blumberg B.S. Geographical distribution of Australia antigen determinants d,y and w. *Nature* 1974;247:38.
- 226.- Banckcroft W.H., Holland P.V., Mazzur S., et al. The geographical distribution of HbsAg subtypes. *Bibliotheca Haematol* 1976; 42:42.
- 227.- Echevarría J.E., León P., López J.A., et al. HbsAg subtype distribution among different populations of HbsAg carriers in Spain. *Eur J Epidemiol* 1995; 11: 1-7.
- 228.- Gerety R.J., Hoofnagle J.H., Nortmann D.F., et al. HbsAg subtypes and indices of clinical disease. *Gastroenterology* 1975; 68: 1253-60.
- 229.- Le Bouvier G. Subtypes of hepatitis B antigen: Clinical relevance? *Ann Intern Med* 1973; 79 (6): 894-6.
- 230.- Green H.T., Turner G.C. Subtypes of hepatitis b antigen among patients and symptomless carriers. *J Hyg Camb* 1975; 74:123-131.
- 231.- Nath N., Fang C.T., Ledman R., et al. Relationship of subtypes of hepatitis B surface antigen with e antigen and its corresponding antibody. *J Infect Dis* 1978; 138: 252-6.
- 232.- Pedreira J., Martínez J.M., Guardia J., et al. HbsAg subtypes in Spain. *Lancet* 1974 (i):98
- 233.- Pedreira J., Martínez J.M., Guardia J., et al. Change of HbsAg subtypes in patients with hepatitis during a five-years period. *J Infec Dis* 1975; 132: 597-600.
- 234.- Coroucé-Pauty A.M., Placon A., Soulier J.P. Distribution of HbsAg subtypes in the world. *Vox Sang* 1983;44:197-211.
- 235.- Gust I.D., Dimitrakakis M., Lucas R. Changing patterns in the distribution of hepatitis B subtypes. *Vox Sang* 1980; 38:81-86.
- 236.- Bruguera M. Epidemiología de la infección por VHB en España. Simposio Nacional sobre estrategias actuales de prevención de la hepatitis B. Gerona, 1991.
- 237.- Echevarría J.E., Tenorio A., Coroucé A.M., et al. PCR can resolve some undefined cases of Hepatitis B virus antigenic subtyping. *J Med Virol* 1994; 42: 217-223.

238.- Yotsumoto S., Okamoto H., Tsuda F., et al. Subtyping HBV DNA in free or integrated forms by amplification of the S-gene sequences by PCR and single-track sequencing of adenine. *J Virol Methods* 1990; 28:107-116.

239.- Blum H.E. Hepatitis B virus: significance of naturally occurring mutants. *Intervirology* 1993; 35:40-50.

240.- Xu K., Yu X., Kong Y, et al. HBV surface antigen proteins with deletions in the preS region. *Sci China B.* 1995; 38: 320-7.

241.- Sominskaia I.V., Sergeeva S.M., Pumpen P.P. PreS-sequence of HBV envelope: molecular biology and immunology. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 1993; 3:15-22.

242.- Yap I., Guan R., Chan S.H. Recombinant DNA hepatitis B vaccine containing PreS components of the HBV coat protein: a preliminary study on immunogenicity. *Vaccine* 1992; 10:439-42.

243.- Tordjeman M., Fontan G., Rabillon V., et al. Characterization of minor and major antigenic regions within the hepatitis B nucleocapsid. *J Med Virol* 1993; 41:221-9.

244.- Yotsumoto S., Kojima M., Shoji I. Fulminant hepatitis related to transmission of hepatitis B variants with precore mutations between spouses. *Hepatology* 1992; 16:31-5.

245.- Okamoto H., Yano K., Nozaki Y., et al. Mutations within the S gene of HBV transmitted from mothers to babies immunized with HBV immune globulin and vaccine. *Pediatr Res* 1992; 32: 264-8.

246.- Fujii H., Moriyama K., Sakamoto N., et al. Gly145 to Arg substitution in Hbs antigen of immune escape mutant of hepatitis B virus. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184: 1152-7.

247.- Roumelotiou A., Papaevangelou G. Chronic liver disease rarely follows acute hepatitis B in non-immunocompromised adults. *Infection* 1992; 20: 221-3.

248.- Ni Y.H., Hsu H.Y., Chang M.H., et al. Absence or delayed appearance of hepatitis B core antigen in chronic HBsAg carrier children. *J Hepatol* 1993; 17: 150-4.

249.- McIntyre A., Nimmo G.R., Wood G.M., et al. Isolated Hbcab can response to hepatitis vaccine help elucidate the cause. *Aust N Z J Med* 1992; 22: 19-22.

250.- Chang C.Y., Lee S.D., Tsai Y.T., Lo K.J. Hepatitis B vaccination alone is inadequate for the categorizing of adults subjects with isolated anti-Hbc. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 192-7.

251.- Baruch Y., Enat R., Gershioni-Baruch R., et al. Anamnestic response to HBV vaccine in nonalcoholic liver cirrhosis patients with and without HBV-DNA. *Am J Gastroenterol* 1992; 87: 613-6.

252.- Lai C.L., Lau Y.J., Yeoh E.K., et al. Significance of isolated anti-Hbc seropositivity by ELISA: implications and the role of radioimmunoassay. *J Med Virol* 1992; 36: 180-3.

253.- Chabaud M., Depril N., Le Cann P., et al. Detection of HBV DNA by PCR in vaccinated and non-vaccinated Senegales children. *Arch Virol Suppl* 1993; 8: 123-31.

254.- Wang Q. Application of HBV gene subtyping method in study on familial transmission. *Chun Hua Liu Hsing Ping Tsa Chih* 1993; 14: 199-203.

255.- Kim Y.S., Ahn Y.O. Factors associated with intrafamilial transmission of hepatitis B virus infection in Korea. *J Korean Med Sci* 1993; 8: 395-404.

256.- Coursaget P., Gharbi Y., Khrouf N., et al. Familial clustering of hepatitis B virus infections and prevention of perinatal transmission by immunization with a reduced number of doses in an area of intermediate endemicity (Tunisia). *Vaccine* 1994; 12: 275-8.

257.- Weeks I., Behesthi F., McCapra A., et al. Acridinium esters as high specific-activity labels in immunoassay. *Clin Chem* 1983; 29: 1474-9.

258.- Vegnente A., Iorio R., Guida S., Cimmino L. Chronicity rate of HBV infection in the families of 60 hepatitis B surface antigen positive chronic carrier: role of horizontal transmission. *Eur J Pediatr* 1992; 151: 188-91.

259.- Yotsumoto S., Kojima M., Shoji I., et al. Fulminant hepatitis related to transmission of hepatitis B variants with precore mutations between spouses. *Hepatology* 1992; 16: 31-5.

260.- Hsu S.C., Chang M.H., Ni Y.H., et al. Horizontal transmission of hepatitis B virus in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 66-9.

261.- Kane M.A. Progress on the control of hepatitis B infection through immunisation. *Gut* 1993; 34:S10-12.

262.- Zanetti A.R., Tanzi E., Romano L., Grappasonni I. Vaccination against hepatitis B: the Italian strategy. *Vaccine* 1993; 11: 521-4.

263.- Lebolleux D., Soumère M., Le Cann P., et al. Loss of anti-HBc antibodies after HBV infection in immunized Senegalese children. *Vaccine* 1993; 11: 486.

264.- Bougy F., Neff V., Fessard C., Cohen J.H. Discordance

in the determination of non- or low- responders to HBV vaccine using IMX-AUSAB or AUSAB-RIA. Vaccine 1993; 11: 485.

265.- Bloom B.S., Hillman A.L., Fendrick A.M., Schwartz J.S. A reappraisal of hepatitis B virus vaccination strategies using cost-effectiveness analysis. Ann Intern Med 1993; 15: 298-306.

266.- Krahn M., Detsky A.S. Should Canada and the United States universally vaccinate infants against hepatitis B? A cost-effectiveness analysis. Med Decis Making 1993; 13: 4-20.

267.- Mahoney F.J., Woodruff B.A., Erben J.J., et al. Effect of hepatitis B program on the prevalence of hepatitis B virus infection. J Infect Dis 1993; 167: 203-7.