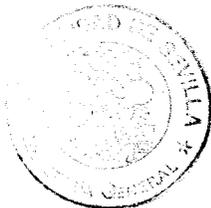


R. 8255

T-431

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE MEDICINA

ESTUDIO BIOQUIMICO HEPATICO  
ENTRE MIEMBROS DE TRES GENERACIONES  
RELACIONADAS CON GESTANTES HBsAg POSITIVAS



UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Queda depositada esta Tesis Doctoral  
al folio 57 número 28 del libro  
correspondiente. 15 OCT. 1990  
Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis

*Alena Raffette*

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en  
de la  
de esta Universidad desde el día  
hasta el día  
Sevilla de de 19  
EL DIRECTOR DE

Tesis presentada por Carmen  
Díez de Celis, para optar -  
al grado de Doctor en Farma  
cia.



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR  
41009 - SEVILLA

Raimundo Goberna Ortíz y Jesús González Vilchez, Director y Co-director, respectivamente, de la Tesis Doctoral titulada "Estudio bioquímico hepático entre miembros de tres generaciones relacionadas - con gestantes HBsAg positivas", de la que es autora Carmen Díez de Celis, autorizan la presentación de la misma ante la Comisión correspondiente, con el fin de obtener el grado de Doctor.

Sevilla cinco de Octubre de mil novecientos noventa

Fdo. Prof. R. Goberna  
Catedrático de Bioquímica  
y Biología Molecular

Fdo. Dr. J. G. Vilchez  
Doctor en Medicina y  
Cirugía



DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA MEDICA Y  
BIOLOGIA MOLECULAR  
41009 - SEVILLA

Comisión de Doctorado  
Universidad de Sevilla

RAIMUNDO GOBERNA ORTIZ, Director del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla da, por la presente, su conformidad a la presentación de la Tesis Doctoral titulada "Estudio bioquímico hepático entre miembros de tres generaciones relacionadas con gestantes HBsAg positivas", de la que es autora Carmen Díez de Celis, bajo mi Dirección y la Co-dirección del Dr. Jesús González Vilchez.

Sevilla Cinco de Octubre de mil novecientos noventa.

*R. Goberna*

Fdo. Prof. R. Goberna  
Director del Departamento

### Agradecimientos

Al Profesor Raimundo Goberna, Director del Departamento, por su Dirección y colaboración.

Al Dr. Jesús González Vilchez, por su inestimable ayuda y disponibilidad en todo momento.

Al Dr. Dr. Félix López Elorza, por su iniciativa y apoyo.

Al Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario "Virgen Macarena" por su valiosa y desinteresada ayuda en la toma de muestras, lo cual ha hecho posible la realización de este trabajo.

Al Servicio de Medicina Preventiva del Hospital Universitario "Virgen Macarena" por su estrecha colaboración.

A mis compañeros del Departamento de Bioquímica del Hospital Universitario "Virgen Macarena", especialmente a Teresa Arias y Lola Gallego.

A Ramiro, Angela, Montse,  
Dolores, Javi y Antonio.

I.- INTRODUCCION .....	1
I.1.- INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B: IMPORTANCIA Y EVOLUCION HISTORICA .....	2
I.2.- CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES .....	3
I.3.- CICLO BIOLOGICO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B .....	6
I.4.- EPIDEMIOLOGIA.....	9
I.5.- TRANSMISION .....	13
I.5.1.- Transmisión horizontal.....	14
I.5.2.- Transmisión vertical .....	16
I.6.- FORMAS CLINICAS DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B .....	19
I.7.- MARCADORES VIRICOS EN LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B .....	20
I.8.- INFECCION MATERNA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B: REPERCUSIONES Y EFECTOS EN EL NIÑO .....	25
I.9.- PREVENCION DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B .....	26
I.10.- PREVENCION DE LA TRANSMISION VERTICAL DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B .....	31
I.11.- VIRUS DE LA HEPATITIS C .....	33

OBJETIVOS .....	37
II.- MATERIAL Y METODOS .....	38
II.1.- GESTANTES .....	39
II.2.- FAMILIARES .....	39
II.3.- SANGRE DEL CORDON .....	39
II.4.- MATERIAL DE LABORATORIO.....	41
II.5.- PROTOCOLO .....	43
II.6.- AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA .....	48
II.7.- ACTIVIDAD DE LAS AMINOTRANSFERASAS SERICAS .....	48
II.7.1.- Aspartatoaminotransferasa .....	48
II.7.2.- Alaninoaminotransferasa .....	49
II.8.- ENZIMAINMUNOENSAYO PARA LOS MARCADORES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B .....	50
II.8.1.- Antígeno de superficie .....	50
II.8.2.- Anticuerpo total del core .....	52
II.8.3.- Anticuerpo de superficie .....	55
II.8.4.- Antígeno E de la hepatitis B .....	57

II.8.5.- Anticuerpo E de la hepatitis B.....	59
II.8.6.- Anticuerpo frente al antígeno de la hepatitis Delta .....	62
II.9.- ENZIMAINMUNOENSAYO PARA EL VIRUS DE LA HE- PATITIS C .....	64
II.9.1.- Anticuerpos frente al Virus de la Hepatitis C .....	64
II. 10.-DETERMINACION DEL DNA-VHB .....	67
II.11.- ACTIVIDAD DE LA DNA POLIMERASA .....	69
III.- RESULTADOS .....	72
III.1.- GESTANTES .....	73
III.2.- GESTANTES HBsAg POSITIVAS .....	80
III.3.- SANGRE DEL CORDON .....	84
III.4.- FAMILIARES DE GESTANTES HBsAg POSITIVAS.....	87
III.5.- VIRUS DE LA HEPATITIS C .....	100
IV.- DISCUSION .....	102
V.- CONCLUSIONES.....	120
VI- BIBLIOGRAFIA .....	123

## **ABREVIATURAS EMPLEADAS**

- ADVP                      Adicto a drogas por vía parenteral.
- ALT                        Alaninoaminotransferasa.
- antiDelta                Anticuerpo frente al antígeno Delta.
- antiHBc-IgG             Anticuerpo frente al antígeno del core de clase IgG.
- antiHBc-IgM            Anticuerpo frente al antígeno del core de clase IgM.
- antiHBe                 Anticuerpo frente al antígeno E.
- antiHBs                 Anticuerpo frente al antígeno de superficie.
- antiVHA-IgM            Anticuerpos frente al virus de la hepatitis A de clase IgM.
- antiVHC                 Anticuerpo frente al virus de la hepatitis C.
- AST                      Aspartatoaminotransferasa.
- CHC                      Carcinoma hepatocelular.
- CHP                      Carcinoma hepatocelular primario.
- DHBV                    Virus de la hepatitis B del pato de Pekín.
- DNA-p                  Enzima DNA polimerasa del virus de la hepatitis B.
- ELISA                    Enzimainmunoensayo.
- GSHV                    Virus de la hepatitis de la ardilla de tierra.

- HBcAg                      Antígeno del core del virus de la hepatitis B.
- HBeAg                      Antígeno E del virus de la hepatitis B.
- HBIG                        Inmunoglobulina antihepatitis B.
- HBsAg                      Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- HCA                         Hepatitis crónica activa.
- HCL                         Hepatitis crónica lobulillar.
- HCP                         Hepatitis crónica persistente.
- HNANB                      Hepatitis no-A, no-B.
- HPT                         Hepatitis post-transfusional.
- OPD                         Orto-fenilendiamina.
- pHSA                        Albúmina sérica humana polimerizada.
- RIA                         Radioinmunoensayo.
- VHB                         Virus de la hepatitis B.
- VHB-DNA                    Acido desoxirribonucleico del virus de la hepatitis B.
- VHC                         Virus de la hepatitis C.
- VHD                         Virus de la hepatitis D.
- WHV                         Virus de la hepatitis de la marmota.

## **I.- INTRODUCCION**

## **I.1.- INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B: IMPORTANCIA Y EVOLUCION HISTORICA.**

El virus de la hepatitis B (VHB) constituye por distintas razones un importante problema de salud pública en todo el mundo. Una de ellas se refiere al elevado número de portadores crónicos del virus, que se calcula supera la cifra de 200 millones de personas. Otra importante razón es la elevada frecuencia con que da lugar a la aparición de hepatitis agudas y además, se debe recordar que los portadores crónicos del VHB pueden sufrir a lo largo de su vida distintos tipos de enfermedades hepáticas, entre los que se incluyen, junto a las diferentes hepatitis crónicas, la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular primario (CHP).

Aunque las primeras descripciones sobre la hepatitis por virus B se remontan a la antigüedad, el progreso de la hepatología fué extraordinariamente lento durante mucho tiempo, acelerándose en los últimos años, en los que pocos descubrimientos médicos despertaron tanto interés como el del antígeno Australia.

Blumberg (1-3), en 1963, descubrió por azar este antígeno en el suero de un aborígen australiano, cuando se encontraba estudiando las variaciones hereditarias de las lipoproteínas séricas humanas mediante un sistema de precipitación en gel de agar, utilizando como fuente de anticuerpos contra estas lipoproteínas el suero de pacientes politransfundidos. El citado autor creyó, en un principio, que había descubierto un antígeno relacionado con la leucemia, porque en estudios posteriores halló dicho antígeno en pacientes con leucemias o con predisposición genética a padecerlas, como son los pacientes con síndrome de Down. Pero cambió de idea cuando un niño con síndrome de Down, que era antígeno Australia negativo, se convirtió en positivo después de haber contraído una hepatitis vírica.

Prince (4), en 1968, sugirió la relación del antígeno Australia con la hepatitis por virus B y estudios posteriores relacionaron el antígeno Australia con el antígeno de la superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg).

Bayer (5), en 1968 y posteriormente Dane (6), en 1970, descubrieron por microscopía electrónica, en el suero de pacientes con el antígeno de superficie positivo,

unas partículas cuya morfología recordaba a la de los virus. Estas partículas eran de tres tipos. Por un lado, partículas esféricas, pequeñas, de 22 nm de diámetro y partículas tubulares, de diámetro similar y longitud variable, identificadas como exceso de material lipoproteico de la cubierta del virus. Por otro lado, partículas también esféricas, pero más grandes, de 42-44 nm de diámetro, llamadas partículas Dane, en las que se apreciaba claramente un núcleo central o "core" y una cubierta periférica, identificadas como el VHB completo.

En 1972, Magnius (7) identificó, en el suero de pacientes infectados por el VHB, un nuevo sistema antígeno-anticuerpo, llamado antígeno e (HBeAg) y su anticuerpo (antiHBe). El citado autor (8), posteriormente observó, que las propiedades inmunológicas, el tamaño y la densidad de este nuevo antígeno, eran diferentes a las del HBsAg.

En 1977, Rizzetto (9), descubrió un nuevo agente vírico en portadores del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (VHB), que denominó agente Delta o virus de la hepatitis D (VHD).

En los últimos 20 años, los avances producidos en distintos campos de la ciencia, como el de la biología molecular, han permitido profundizar en el conocimiento de la hepatitis por virus B así como en el del agente que la produce.

## **1.2.- CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES.**

Summers (10), describe el VHB como un virus complejo que pertenece al grupo de los "hepadnavirus", llamados así por poseer un genoma constituido por ácido desoxirribonucleico (DNA) y ser hepatotropos.

A este grupo pertenecen también los virus de la hepatitis de la marmota (WHV), de la ardilla de tierra (GSHV) y el virus de la hepatitis B del pato de Pekín (DHBV). Todos ellos tienen una estructura común y características muy similares. Sólomente el VHB y el WHV pueden causar hepatitis crónica activa y carcinoma hepatocelular (CHC).

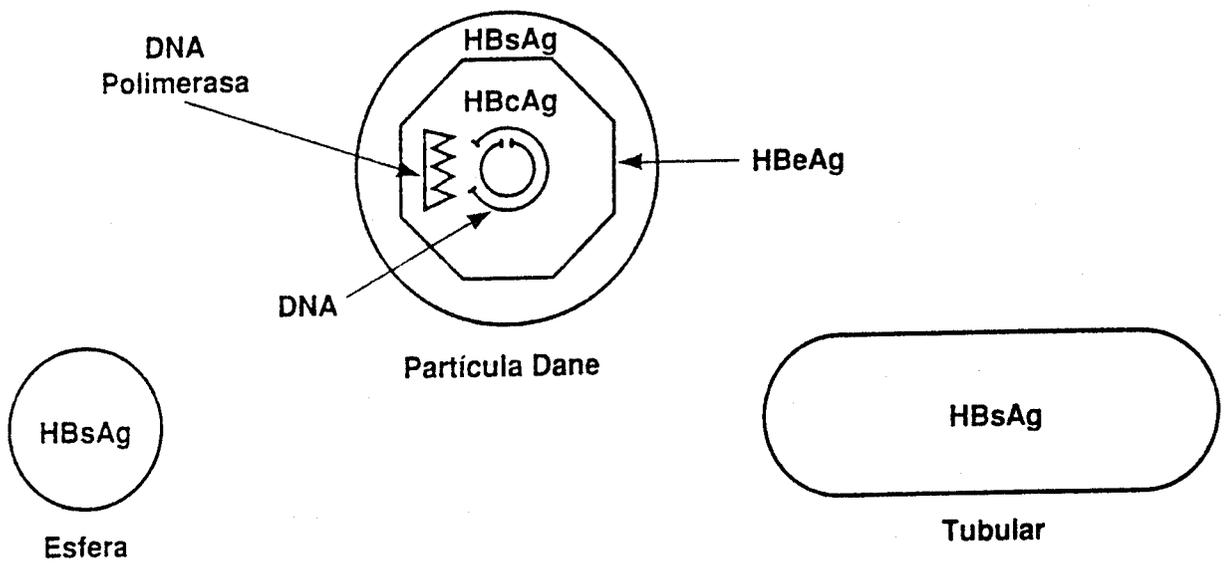
El estudio por microscopía electrónica de sueros de sujetos infectados por el VHB, muestra partículas de diferentes tamaños y formas. En primer lugar se pueden observar partículas esféricas de 42 nm de diámetro, llamadas partículas Dane, que representan el VHB completo. Están formadas por una cubierta externa y un núcleo denso de 27 nm de diámetro, llamado nucleocápside. Se observan también otras partículas esféricas, de 22 nm de diámetro y otras con forma tubular, el mismo diámetro y longitud variable, formadas por material idéntico al de la cubierta externa de las partículas Dane, pero sin estructuras centrales o nucleares.

En la cubierta externa del VHB se localiza el antígeno de superficie (HBsAg) y en el núcleo, se encuentran, el antígeno del core (HBcAg) y el antígeno e (HBeAg). Además, existe una doble cadena circular y asimétrica de DNA vírico (DNA-VHB), y una enzima con actividad DNA-polimerasa (DNA-p), que interviene en la síntesis del DNA del VHB. (Figura 1).

Tiollais (11,12), indica que el genoma del VHB está formado por una molécula de DNA circular, con dos cadenas de diferente longitud. La cadena más larga, llamada L(-), tiene siempre una longitud aproximada de 3200 nucleótidos. La segunda cadena, llamada S(+), tiene una longitud variable que oscila entre el 20-80 % de la longitud de la cadena L(-).

Dentro de la cadena L(-) se pueden distinguir 4 regiones responsables de la síntesis de las distintas proteínas del VHB y que se describen a continuación:

- 1) **REGION S**, que puede ser dividida en dos partes: pre-S y S; a su vez, la región pre-S se subdivide en pre-S1 y pre-S2. La región S codifica la proteína de la cubierta vírica (HBsAg). La proteína codificada por la región pre-S2 contiene un receptor para la albúmina sérica humana polimerizada (pHSA). Los hepatocitos también tienen receptores para dicha proteína, lo que hace pensar en el papel mediador de la misma en la unión del VHB a los hepatocitos. Asimismo, la proteína codificada por la región pre-S1 puede participar también en dicha unión.
- 2) **REGION C**, que codifica la síntesis del HBcAg y HBeAg.



**FIGURA 1:** Estructura del virus de la hepatitis B y sus antígenos.

3) **REGION P**, que codifica la síntesis de la DNA-p.

4) **REGION X**, que codifica la síntesis de un polipéptido no identificado. (Figura 2).

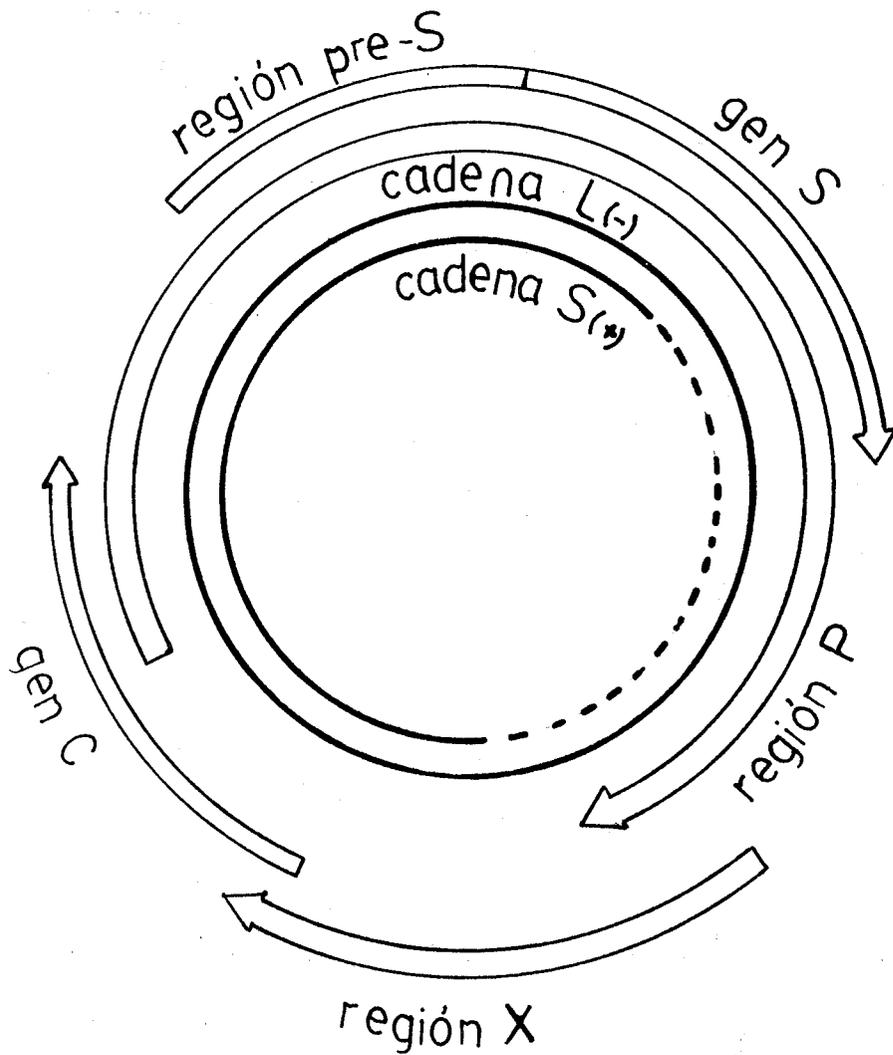
Rizzetto (13), describe el virus de la hepatitis D (VHD) como un virus defectivo porque necesita al VHB para infectar a un sujeto. El estudio por microscopía electrónica del suero de sujetos infectados por el VHD muestra partículas esféricas de 35-37 nm de diámetro, en cuyo interior se encuentra una proteína, llamada antígeno delta y una molécula de RNA de bajo peso molecular, todo ello rodeado de una cubierta externa formada principalmente por HBsAg. (Figura 3).

### **I.3.- CICLO BIOLÓGICO DEL VHB.**

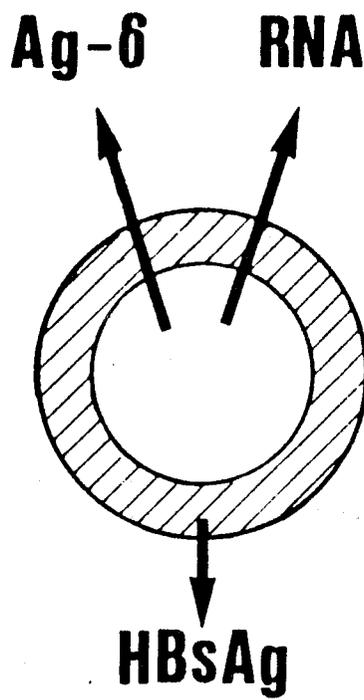
Ganem (14), indica que el mecanismo de replicación del VHB difiere de forma notable de los mecanismos utilizados por otros virus-DNA similares. La característica principal del VHB es la utilización de una molécula de RNA como intermediario en su replicación, incluyendo un paso de transcripción inversa.

El ciclo replicativo del VHB consta de los siguientes pasos:

- 1) El virión o VHB completo penetra en el interior del hepatocito, y su genoma (DNA), en el núcleo del mismo.
- 2) La doble cadena, circular y abierta de DNA, se completa.
- 3) La doble cadena circular de DNA se cierra por enlaces covalentes y se produce un superenrollamiento, seguido de la transcripción del DNA a una molécula de RNA, llamada pregenoma, por la acción de una RNA-polimerasa, presumiblemente de la célula infectada.
- 4) El pregenoma se recubre de una nucleocápside y sale desde el núcleo al citoplasma del hepatocito.



**FIGURA 2:** Estructura del genoma del VHB. El genoma del VHB está formado por dos cadenas circulares de DNA, una de ellas incompleta. En la figura se indican mediante flechas, las cuatro regiones del genoma que codifican las proteínas del VHB: región S, P, C y X.



**FIGURA 3:** Estructura del virus de la hepatitis D

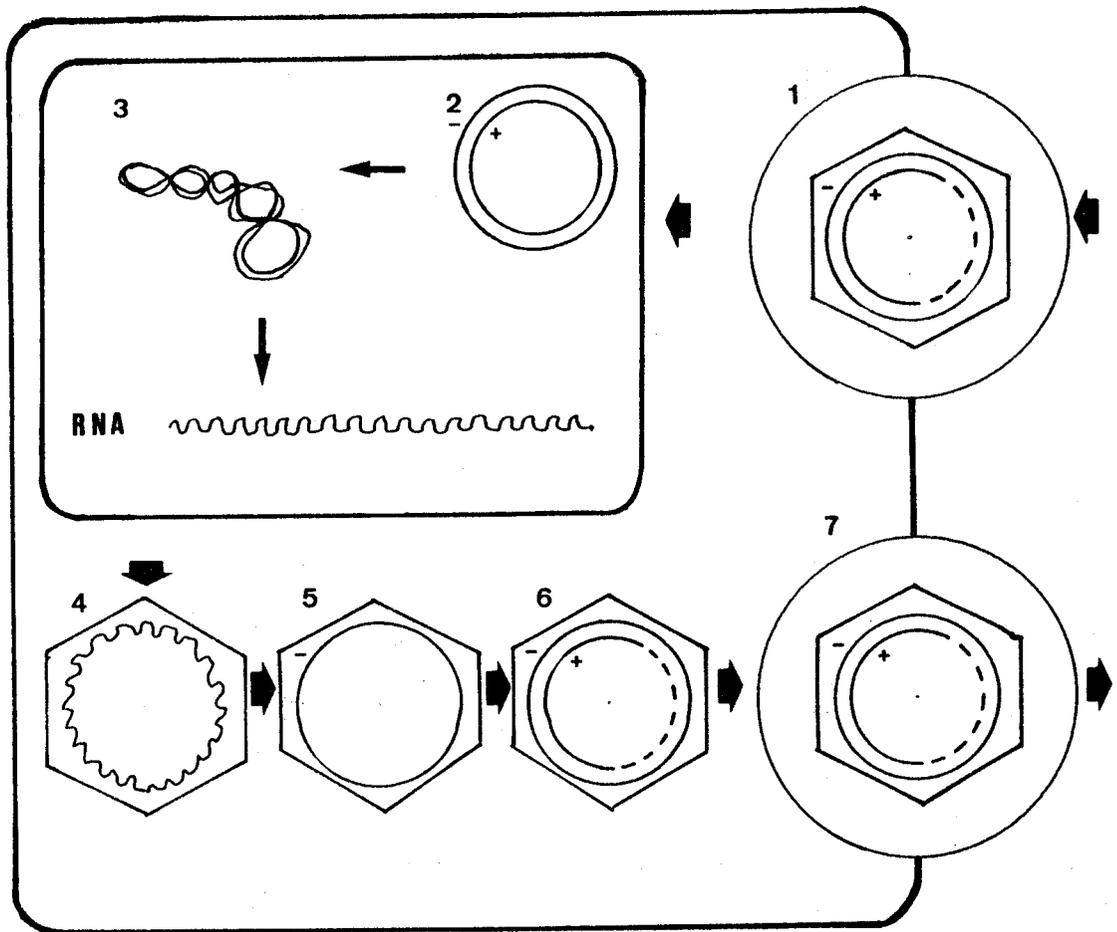
- 5) Se sintetiza la cadena de DNA L(-) a partir del pregenoma, por la acción de una enzima denominada transcriptasa inversa.
- 6) Se sintetiza la cadena de DNA S(+).
- 7) La nucleocápside se rodea de la cubierta externa, formando un virion que sale del hepatocito, completándose el ciclo. (Figura 4).

#### **I.4.- EPIDEMIOLOGIA.**

La infección por el VHB está presente en todo el mundo, y por ello es un problema mundial de salud pública. Zuckerman (15), distingue tres zonas geográficas, teniendo en cuenta la prevalencia del HBsAg, que indica infección crónica por el VHB y la prevalencia de los anticuerpos frente al antígeno del core (antiHBc) y frente al antígeno de superficie (antiHBs), que indican infección o contacto con el VHB en el pasado. (Tabla 1).

Así, en primer lugar, existe una zona de alta prevalencia, que incluye el Sudeste Asiático, África Subsahariana y Pacífico Occidental, con una tasa de HBsAg positivo que oscila entre el 5-20 % y donde el 70-95 % de la población presentan evidencias de infección por el VHB en el pasado. En estos lugares, la infección es muchas veces subclínica y se piensa que los principales mecanismos responsables de la misma son la transmisión materno-infantil o vertical, y la transmisión persona a persona u horizontal, durante los primeros años de la vida.

En segundo lugar, existe una zona de prevalencia intermedia que incluye Europa Oriental, Oriente Próximo, Sur-Oeste Asiático, América del Sur y Central y los países Mediterráneos, entre los que se encuentra España, con una tasa de HBsAg positivo que oscila entre el 1-5 % y donde el 20-55 % de la población presentan antiHBc y/o antiHBs positivos. En esta zona intervienen todos los mecanismos de transmisión, vertical, horizontal, parenteral y sexual, sin que se pueda atribuir una mayor responsabilidad a uno más que a otro.



**FIGURA 4: CICLO REPLICATIVO DEL VHB.** El viri3n penetra en el interior del hepatocito y su genoma en el n3cleo del mismo (1). La doble cadena de DNA circular y abierta, se completa (2). La doble cadena de DNA se cierra y se produce un superenrollamiento, seguido de la transcripci3n del DNA a una mol3cula de RNA, llamada pregenoma (3). El pregenoma se recubre de la nucleoc3pside y sale desde el n3cleo al citoplasma del hepatocito (4). Se sintetiza la cadena del DNAL(-) (5). Se sintetiza la cadena de DNAS(+) (6). La nucleoc3pside se rodea de la cubierta externa formando un viri3n que sale del hepatocito (7).

**TABLA 1**  
**PREVALENCIA DE LA HEPATITIS B**

<b>ZONA GEOGRAFICA</b>	<b>HBsAg</b>	<b>antiHBc y/o antiHBs</b>
SUDESTE ASIATICO AFRICA SUBSAHARIANA PACIFICO OCCIDENTAL	5-20 %	70-95 %
PAISES MEDITERRANEOS EUROPA ORIENTAL ORIENTE PROXIMO AMERICA LATINA	1-5 %	20-55 %
ESTADOS UNIDOS CANADA, AUSTRALIA NUEVA ZELANDA NORTE DE EUROPA	< 1 %	< 10 %

Por último, existe una zona de baja prevalencia, que incluye a los países con mayor desarrollo económico y social, como Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda y los países Occidentales del Norte de Europa. En ellos, la tasa de HBsAg positivo es siempre inferior al 1 % y menos del 10 % de la población presentan evidencias de infección en el pasado por el VHB. En estos países, los sujetos infectados pertenecen en su mayoría a colectivos expuestos de manera especial al VHB, como los adictos a drogas por vía parenteral (ADVP), personal sanitario, homosexuales masculinos promiscuos, prostitutas y reclusos. En estos casos, la transmisión se produce fundamentalmente por vía parenteral y/o vía sexual.

La infección crónica por el VHB incrementa el riesgo de padecer carcinoma hepatocelular primario (CHP). Las observaciones clínicas y los estudios epidemiológicos llevados a cabo en los últimos años han puesto de manifiesto la estrecha relación existente entre el VHB y el CHP. Esta relación se basa en los hechos que se exponen a continuación:

En primer lugar, Smuzness (16), ha observado una coincidencia en la distribución geográfica, de forma que las zonas de alta prevalencia para el HBsAg muestran alta incidencia de CHP, como son Asia y África. Asimismo, las zonas de baja prevalencia para el HBsAg, son también zonas de baja incidencia de CHP, como Estados Unidos, Europa Occidental y Australia.

En segundo lugar, el riesgo de padecer CHP entre la población HBsAg positiva, en las zonas de alta prevalencia para este antígeno, es mucho más alto que entre la población no portadora de dicho antígeno, como muestra el estudio prospectivo llevado a cabo por Beasley (17) en Taiwan, en el año 1981, aunque, según Prince (18), no existen suficientes datos para afirmar que ocurra lo mismo en las zonas de baja prevalencia para el HBsAg.

En tercer lugar, Summers (19) indica la aparición de tumores en el hígado de marmotas, infectadas por el virus de la hepatitis de la marmota (WHV), que como se ha indicado, es de características estructurales y epidemiológicas muy similares a las del VHB.

Por último, Shafritz (20) ha encontrado el DNA del VHB integrado en el genoma

de los hepatocitos en pacientes con CHP. Por otra parte, la distribución geográfica del agente Delta o virus de la hepatitis D (VHD), es según Rizzetto (13), irregular y algunas veces confusa. Por un lado, se ha encontrado alta prevalencia de anticuerpos frente al antígeno delta (antiDelta) en Italia, especialmente en el Sur del país, donde hasta el 50 % de la población HBsAg positiva, con enfermedad crónica del hígado, presentan antiDelta positivo. Además Rizzetto (21) y Smedile (22), han encontrado alta prevalencia de antiDelta en los países escandinavos, frente a la baja prevalencia encontrada en los países vecinos del Norte de Europa.

Los datos epidemiológicos aportados por Rizzetto (21), indican que el VHD es endémico en el Sudeste de Europa, Africa y América del Sur, y que se encuentra principalmente entre la población HBsAg positiva que ha estado en contacto con sangre o derivados de la misma. Así, según Raimondo (23) los ADVP son, actualmente, el colectivo con mayor riesgo de contraer la infección por el VHD y de transmitirla, en Europa Occidental.

También se han observado epidemias de hepatitis Delta en diferentes partes del mundo, como ocurrió en Nápoles, en el año 1977 (21) y en Venezuela en 1981 (24).

Por último, cabe destacar el hecho de que en el Sudeste Asiático, a pesar de la alta prevalencia de la infección por el VHB, la infección por el VHD es poco frecuente y ha sido descrita en contadas ocasiones. La razón de este hallazgo se desconoce, aunque se podría pensar, que la infección por el VHD no se ha extendido todavía por esta zona, o que existe resistencia genética a la misma entre la población oriental (21).

### **I.5.- TRANSMISION.**

No se conoce ningún reservorio animal importante del VHB, aunque existen evidencias aisladas de que algún primate superior haya podido ser infectado; asimismo, no hay ninguna prueba de que puedan ser fuente de infección para el hombre.

El único reservorio del VHB está constituido por los sujetos infectados. Se sabe que más de 200 millones de personas en todo el mundo son portadores crónicos del VHB, y que la mitad de la población mundial contrae a lo largo de la vida una infección clínica o

subclínica , por este agente.

La vía de transmisión más importante y frecuente es la vía parenteral, a través de transfusiones de sangre, plasma, fibrinógeno y material de laboratorio como jeringas y agujas. Dentro de esta misma vía existen otros vehículos de transmisión como son los objetos de aseo personal (tijeras, peines), instrumental médico (aparatos de endoscopia, odontología y diálisis) y los insectos hematófagos.

El personal sanitario y los ADVP son los dos colectivos con mayor riesgo de contraer la infección por vía parenteral. Así, para el primero de ellos, se considera la hepatitis B como enfermedad profesional en casi todas las legislaciones, entre ellas la española.

Por otro lado, se ha encontrado el HBsAg en numerosas secreciones corporales de sujetos infectados por el VHB, como saliva, semen, sudor, orina, lágrimas, leche materna, secreciones vaginales, bilis, líquido cefalorraquídeo y líquido pleural. En todas ellas, el HBsAg se encuentra a concentraciones mucho más bajas que en el suero, por lo que teóricamente se necesitarían grandes cantidades de estos líquidos biológicos para que fuesen realmente infecciosos.

Sólo a través de la saliva y el semen se ha conseguido transmitir la infección por el VHB, pero la mayoría de las veces se ha visto que la sangre sigue jugando el papel más importante en dicha transmisión.

Teniendo en cuenta las personas que transmiten la infección, a quién se la transmiten y la vía utilizada, se puede hablar de dos formas de transmisión del VHB, horizontal y vertical.

#### **I.5.1.- Transmisión horizontal.**

La transmisión horizontal del VHB es la que tiene lugar desde un sujeto infectado a otro miembro de la comunidad.

El VHB es muy resistente a los agentes fisicoquímicos, sin embargo, la transmisión mediada por objetos contaminados sólo se deberá tener en cuenta cuando

la barrera cutáneo-mucosa se encuentre alterada, ya que si se mantiene íntegra no es adecuada para la penetración del VHB.

Tampoco es adecuada la vía oral, aunque Ward (25) y Heathcote (26) han visto que el HBsAg se puede encontrar en la saliva de personas que lo tienen positivo, a su vez, en el suero. Pero los intentos llevados a cabo por Osterholm (27) y Scott (28), de transmitir por vía oral la hepatitis B a chimpancés, utilizando saliva HBsAg positiva, han fracasado, y sólo han tenido éxito cuando la saliva era inoculada por vía parenteral, según los trabajos publicados por Scott (28) y Alter (29). Por otra parte, Brotman (30), ha observado, de forma aislada, la presencia del HBsAg en insectos hematófagos, y aunque se cree que el VHB no se replica en ellos, sí podrían transmitir la infección al hombre. Sin embargo, ésto no se ha podido demostrar y su importancia parece ser mínima. Así, en los países tropicales habría que buscar otros factores y vías de transmisión para justificar la alta prevalencia del HBsAg.

La importancia de la transmisión del VHB por vía sexual se basa en las siguientes observaciones:

- 1) Koff(31), indica, que la infección por el VHB en familiares o personas que conviven con sujetos HBsAg positivos, es más frecuente entre sus compañeros sexuales, que en las personas con las que tienen otros vínculos familiares.
- 2) Fulford (32), señala , que la infección por el VHB en prostitutas y heterosexuales promiscuos, es más frecuente que en la población general.
- 3) Dietzman (33), observa, que la prevalencia de la infección por el VHB en homosexuales masculinos es muy elevada.
- 4) Heathcote (26) y Darani (34) han demostrado la presencia del HBsAg en semen y secreciones vaginales junto con sangre menstrual, respectivamente.
- 5) Scott (28) y Alter (29), han conseguido transmitir la infección por el VHB a chimpancés y monos, por inoculación subcutánea e intravaginal de semen procedente de sujetos que tenían el HBsAg positivo en el suero.

La alta prevalencia de la infección por el VHB entre hombres homosexuales, se atribuye a los frecuentes traumatismos de los vasos sanguíneos de la mucosa rectal, que se producen durante las prácticas homosexuales.

En el caso de las parejas heterosexuales, se piensa que el VHB del semen, penetra a través de los vasos sanguíneos de la mucosa vaginal, aunque los traumatismos del tracto genital femenino son menos frecuentes que en los hombres homosexuales.

Por todo lo citado anteriormente, la inoculación, advertida o no, de sangre, es la principal vía de transmisión horizontal del VHB.

### **I.5.2.- Transmisión vertical.**

La transmisión vertical es la que tiene lugar desde la gestante o madre HBsAg positiva al feto o recién nacido.

El término de transmisión vertical es el más empleado por los autores, aunque existen numerosos nombres para referirse a ella, como transmisión materno-infantil o transmisión madre-hijo del VHB.

Schweitzer (35), en 1970, describió los primeros casos de transmisión vertical del VHB, y desde entonces, otros muchos casos se han descrito (36-39).

La transmisión vertical es más frecuente en los países que tienen un gran número de gestantes HBsAg positivas, como ocurre en el Sudeste Asiático y África Subsahariana (40-46). Sin embargo, en estas dos zonas, la frecuencia de la transmisión vertical es diferente. Así, mientras que en Taiwan, Beasley (44) ha encontrado que cerca del 40 % de los niños portadores crónicos del VHB se infectaron por transmisión vertical, en África, por el contrario, Prince (43), Whittle (45) y Marinier (46), han observado, que la transmisión horizontal, fundamentalmente durante la infancia, predomina sobre la transmisión vertical.

En Estados Unidos y Norte de Europa, la transmisión vertical es responsable de la

infección por el VHB en menos del 10 % de los casos (47-50), mientras que en España, Genescá (51) calcula que ésta ocurre entre el 15-25 %.

Esta variación en la frecuencia de la transmisión vertical en las distintas zonas geográficas, no sólo depende del número de madres portadoras del virus existente en cada zona, sino también, y fundamentalmente, del grado de infectividad de las mismas, que está en relación con el HBeAg y el DNA-VHB, ya que su presencia aumenta considerablemente el riesgo de transmisión de la infección por el VHB (52-60).

Según Chen (57) y Aldershvile (55), la prevalencia del HBeAg es mayor en el Sudeste Asiático que en el resto de los continentes, en los que predomina el antiHBe.

En un estudio llevado a cabo por Stevens (54), en Taiwan, en el año 1979, se observó que el 95 % de los hijos de madres HBeAg positivas se infectaron, y de éstos, el 83 % se convirtieron en portadores crónicos del VHB. Según Aldershvile (55), este riesgo tan elevado, es independiente de la zona geográfica estudiada.

En los casos de madres antiHBe positivas o madres negativas para el HBeAg y el antiHBe, el riesgo de transmisión de la infección, es considerablemente menor, en torno al 12 % y 25 %, respectivamente (52,54,61,62).

El mecanismo exacto de la transmisión vertical no está totalmente aclarado, pero Lee (63) y Zuckerman (15) piensan que ésta se puede producir por una contaminación de sangre materno-fetal, a través de roturas de la placenta, o por el contacto del niño en el canal del parto o poco después de nacer, con sangre o secreciones maternas contaminadas, a través de erosiones de la piel y mucosas.

Wong (64,65), considera que la transmisión vertical del VHB, antes del parto, ocurre sólo en el 5 % de los casos, ya que el VHB no atraviesa con facilidad la placenta íntegra (53,63,66,67).

Para Alexander (68), sin embargo, el VHB sí atravesaría la placenta, pero debido a que el feto recibe de forma pasiva los anticuerpos antiHBc-IgG maternos, no se produciría replicación viral ni expresión antigénica alguna, hasta después del nacimiento, una vez que dichos anticuerpos desaparecen.

Linneman (69) y Boxall (70), han demostrado la presencia del HBsAg en la leche materna, sin embargo, el riesgo de que a través de la misma se pueda transmitir la infección por el VHB, es mínimo. Estudios realizados por Beasley (71), en el año 1975, y Derso (41), en el año 1978, han puesto de manifiesto que los niños que se alimentan con leche materna, no están expuestos a un mayor riesgo de contraer la infección.

Las recomendaciones actuales permiten la lactancia en los niños que han recibido inmunoprofilaxis al nacer, y se considera, que en los países subdesarrollados, en los que este tipo de alimentación previene enfermedades gastrointestinales y nutricionales, no se debe suprimir en ningún caso (72-74).

Martino (73) y Snyderman (74), también han demostrado la presencia del HBsAg en sangre del cordón umbilical de niños nacidos de madres HBsAg positivas. Su presencia puede deberse a la contaminación con sangre materna o a la infección por el VHB, antes del parto o durante el mismo.

Con frecuencia, el hallazgo del HBsAg positivo en sangre del cordón, no se confirma en posteriores análisis, realizados en el suero del niño, por lo que se piensa que su presencia puede ser debida a la contaminación con sangre materna.

Según Mollica (77), también puede ocurrir que el HBsAg desaparezca en los días posteriores al parto, y se vuelva a detectar varias semanas después del nacimiento, coincidiendo con el inicio de la replicación viral, en los casos en los que la infección se produjo en el momento del parto.

Si la infección tuvo lugar antes del parto, el antiHBc-IgM debería ser positivo en la sangre del cordón, pero Goudeau (78), indica que este hecho ocurre en muy pocas ocasiones, por lo que su ausencia no debe descartar siempre la posibilidad de infección del feto, posibilidad que se tendrá en cuenta, según Wong (65), cuando el título del HBsAg en el suero del niño, durante los primeros días de vida, sea igual o superior al encontrado en la sangre del cordón o si el HBsAg persiste en el suero, con independencia del título encontrado, a pesar de la administración de inmunoglobulina antihepatitis B (HBIG) al nacer.

Los anticuerpos de clase IgG, presentes en la circulación materna, (antiHBc,

antiHBs, antiHBe y antiDelta), pasan al feto, al igual que otras inmunoglobulinas de clase IgG (76,79,80).

## **I.6.- FORMAS CLINICAS DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS**

### **B.**

La infección por el VHB se puede manifestar con diversas formas clínicas. Una de ellas es la hepatitis aguda, que aparece en el 20-30 % de los sujetos infectados por el VHB. De éstos, el 99 % de los casos se resuelve favorablemente y el 1 % restante puede sufrir una hepatitis aguda fulminante, que puede llevar a la muerte, por insuficiencia hepática.

Por otro lado, el 60-70 % de los sujetos infectados por el VHB, tienen una infección subclínica, que transcurre y se resuelve sin manifestaciones clínicas objetivas. Los sujetos que han tenido una infección de este tipo se pueden identificar por la presencia en el suero de antiHBc y antiHBs.

Por último, aparece infección crónica en el 5-10 % de los sujetos infectados por el VHB durante la vida adulta. Este porcentaje aumenta si la infección tiene lugar durante la infancia, alcanzando su máximo valor cuando se produce en los primeros meses de vida. El paso a la cronicidad parece guardar relación con la calidad de la respuesta inmunológica del paciente. Si dicha respuesta no es adecuada, el VHB no se elimina de las células (hepáticas, mononucleares y de la médula ósea), con lo que la infección se perpetúa.

Los sujetos que padecen infección crónica por el VHB se caracterizan por la presencia del HBsAg en suero durante un período mínimo de 6 meses, por ello son llamados también portadores crónicos del HBsAg.

Teniendo en cuenta las características clínicas, bioquímicas, serológicas e histológicas de los portadores crónicos del HBsAg, se podrían separar en dos grupos. El primero de ellos sería el grupo de los “portadores sanos”, que estaría formado por las personas con HBsAg positivo en el suero, que no presentan síntomas de enfermedad

crónica del hígado, tienen actividad normal de aminotransferasas séricas y no presentan HBeAg, DNA-VHB ni DNA-p en el suero. La biopsia hepática, en estos pacientes, revela un hígado normal o con pequeñas alteraciones histológicas inespecíficas. Un dato característico es la presencia del HBsAg en el citoplasma de los hepatocitos y la ausencia del HBcAg en los mismos.

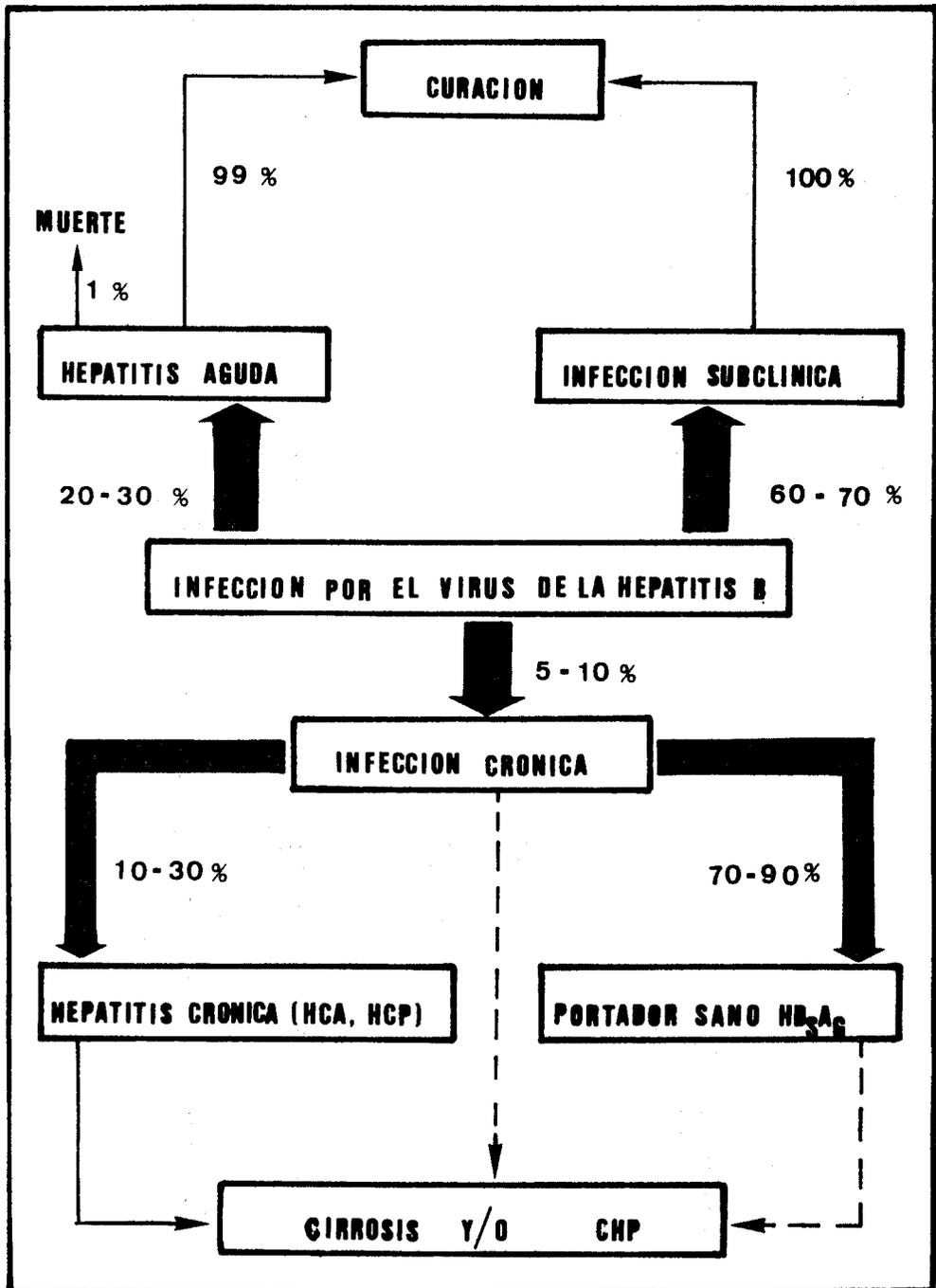
Aproximadamente el 70-90 % de las personas que tienen infección crónica por el VHB se pueden considerar “portadores sanos”, y tienen un riesgo mayor que el de la población normal de padecer carcinoma hepatocelular primario (CHP).

El segundo grupo estaría formado por las personas con hepatitis crónica tipo B, que presentan un proceso necrótico-inflamatorio del hígado, con HBsAg en el suero. Estos enfermos suelen tener actividad elevada de las aminotransferasas séricas y HBeAg, DNA-VHB y/o actividad de la DNA-p en el suero. La biopsia hepática revela la existencia de alteraciones histológicas de mayor o menor grado, que nos permiten clasificar estos procesos en: hepatitis crónica persistente (HCP), hepatitis crónica activa (HCA) y hepatitis crónica lobulillar (HCL), en función de la extensión y gravedad del proceso necrótico-inflamatorio portal y del parénquima.

Aproximadamente el 10-30 % de los sujetos con infección crónica por el VHB sufren una hepatitis crónica de uno u otro tipo (HCP, HCA y HCL) y tienen un elevado riesgo de padecer cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular primario (CHP). (Figura 5).

### **I.7.- MARCADORES VIRICOS EN LA INFECCION POR EL VHB.**

Los tres antígenos principales del VHB (HBsAg, HBcAg y HBeAg), al penetrar en el organismo humano, dan lugar a la aparición de sus anticuerpos correspondientes (antiHBs, antiHBc y antiHBe). Todos ellos, antígenos y anticuerpos, junto con el DNA-VHB y la DNA-p, se denominan marcadores del VHB. La presencia de unos u otros, en el suero de los sujetos infectados, además de sus características clínicas, bioquímicas e histológicas, permiten distinguir las formas agudas y crónicas de la infección por el VHB y hacer un pronóstico de su evolución.



**FIGURA 5:** Representación de las distintas formas de evolución de la infección por el virus de la hepatitis B.

En la hepatitis aguda tipo B, con evolución favorable, el HBsAg aparece en el suero dos a cuatro semanas antes del inicio de los síntomas clínicos y del aumento de la actividad de las aminotransferasas séricas, alcanzando una concentración máxima durante la fase aguda de la infección y disminuyendo gradualmente hasta desaparecer al cabo de 4-6 meses. De forma simultánea o al poco tiempo de su desaparición, aparece el antiHBs, que puede persistir durante toda la vida, en más del 80 % de los casos.

El HBeAg aparece en el suero poco después de hacerlo el HBsAg. Su presencia indica replicación vírica activa. Cuando el HBsAg comienza a disminuir, el HBeAg desaparece del suero y aparece el antiHBe.

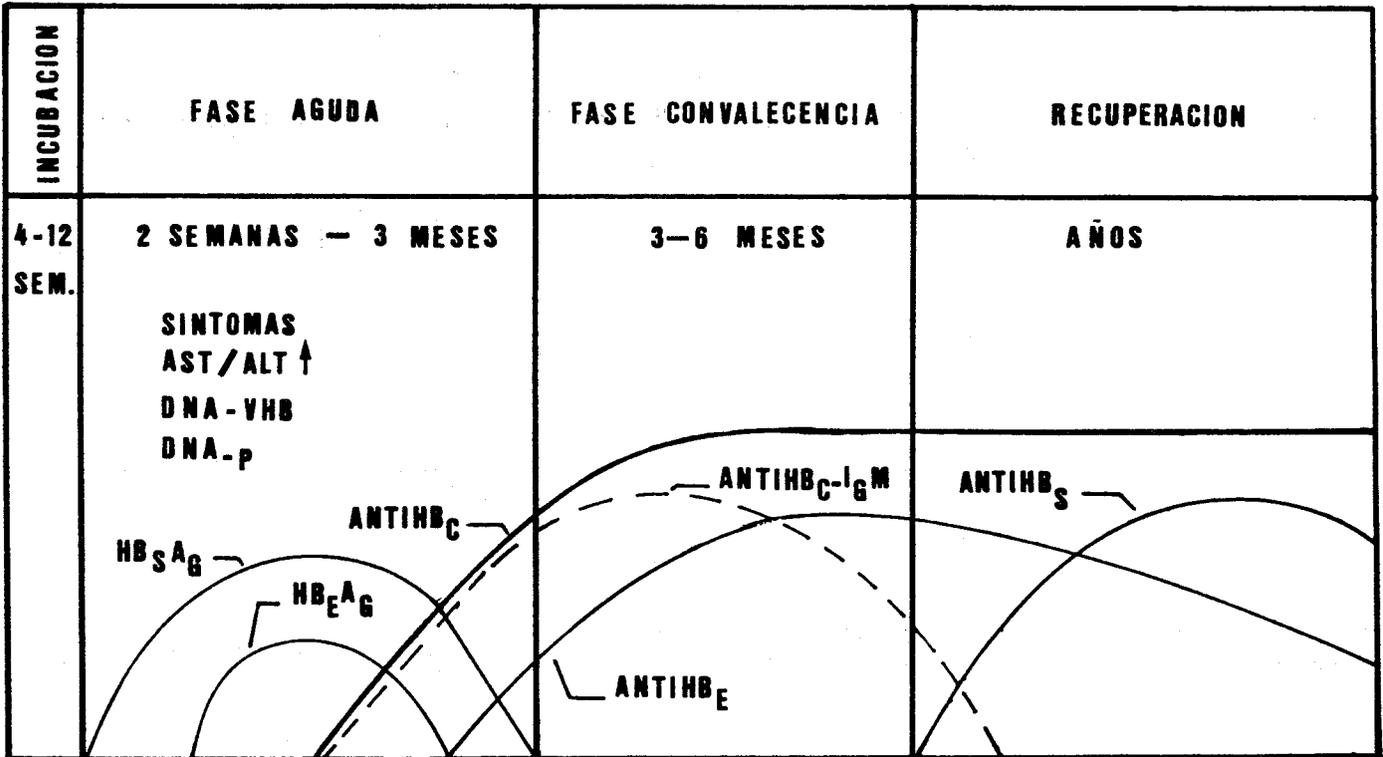
El HBcAg no se detecta en el suero por los procedimientos habituales, pero sí su anticuerpo (antiHBc), aproximadamente a las dos semanas de aparecer el HBsAg.

El antiHBc es mayoritariamente de clase IgM, durante la fase aguda de la infección, y de clase IgG durante la fase de recuperación, persistiendo éste último, en la mayoría de los casos, a lo largo de toda la vida.

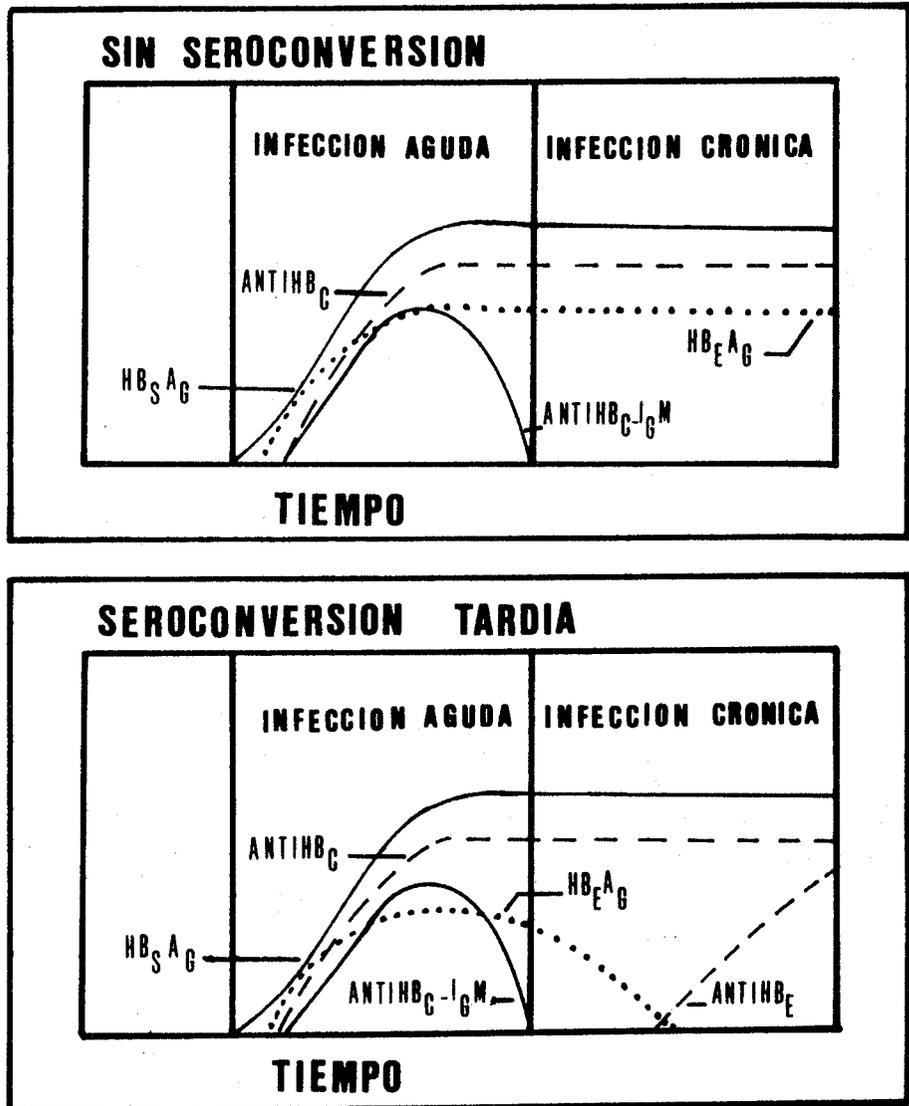
El DNA-VHB y la DNA-p, se pueden detectar poco después de aparecer el HBsAg y su presencia en suero constituye evidencia de replicación vírica activa. (Figura 6).

Cuando el HBsAg persiste durante más de 6 meses, en el suero de las personas infectadas, se habla de infección crónica por el VHB o portadores crónicos del HBsAg. En el suero de todos estos pacientes, además del HBsAg y antiHBc (IgG), se puede detectar el HBeAg (portadores crónicos sin seroconversión) o el antiHBe (portadores crónicos con seroconversión). (Figura 7).

En uno u otro caso, el DNA-VHB puede estar presente, indicando siempre replicación vírica activa, cuando se detecta en el suero del enfermo.



**FIGURA 6:** Perfil serológico de la hepatitis aguda tipo B.



**FIGURA 7:** Perfil serológico de los portadores crónicos del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.

## **I.8.- INFECCION MATERNA POR EL VHB: REPERCUSIONES Y EFECTOS EN EL NIÑO.**

Según Snyderman (74) y Shalev (81), la infección por el VHB no aumenta el riesgo de malformaciones congénitas, muerte intraútero, abortos o retraso en el crecimiento del feto, pero sí puede incrementar el riesgo de que los niños nazcan prematuros si la madre se infecta durante el último trimestre del embarazo.

Cuando el feto o el recién nacido sufren infección por el VHB, a través de un mecanismo de transmisión vertical, las formas en las que se puede manifestar dicha infección son, en líneas generales, semejantes a las descritas para los adultos que sufren infección por el VHB, pero según Beasley (82), con dos diferencias fundamentales: los niños se convierten en portadores crónicos del VHB con mayor frecuencia que las personas que se infectan durante la vida adulta y además, tienen un riesgo mayor de padecer enfermedad hepática crónica, cirrosis o carcinoma hepatocelular primario, a lo largo de su vida.

El riesgo de convertirse en portadores crónicos del VHB es mayor cuanto menor sea la edad a la cual se adquiere la infección. Así, mientras en los adultos este riesgo es del 5-10 %, en los niños puede llegar hasta el 80-85 %, sobre todo si la madre es HBeAg positiva (54).

Según Sasaki (83), el riesgo de que estos niños sean, a su vez, HBeAg positivos, es también mayor, cuanto menor sea la edad a la cual se adquiere la infección y en cuanto al sexo, en los niños, al igual que en los adultos, la infección crónica por el VHB, junto con la presencia del HBeAg, es más frecuente en los varones que en las hembras.

Es importante destacar, desde el punto de vista epidemiológico, que los niños portadores crónicos del VHB, pueden transmitir la infección a otras personas, a lo largo de su vida, y en el caso de las hembras, a sus propios hijos, completándose el ciclo con nuevos casos de transmisión vertical.

La transmisión vertical del VHB es una de las causas más importantes de la infección por este virus durante la infancia. Numerosos trabajos describen diferentes formas

clínicas de la infección, que incluirían procesos crónicos, de mayor o menor gravedad: estado de portador sano del HBsAg, HCP, HCA, cirrosis y CHP (84-90) y procesos agudos: formas leves, transitorias o severas de hepatitis B aguda y hepatitis fulminante (50,91,92).

### **I.9.- PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL VHB.**

La alta prevalencia de la infección por el VHB, la gravedad de algunas de sus manifestaciones clínicas y la ausencia de pautas terapéuticas para la mayoría de ellas, han creado la necesidad de establecer medidas preventivas basadas en los avances producidos en el conocimiento de la epidemiología y la biología del VHB, así como en la posibilidad de identificar a las personas infectadas o inmunizadas.

La prevención de la infección por el VHB incluye medidas generales y la inmunoprofilaxis pasiva y/o activa, tanto en los casos de exposición accidental al virus, como en los grupos de población con elevado riesgo de infección.

Las medidas generales de prevención de la infección por el VHB son las siguientes:

- Extremar las medidas de higiene general.
- Evitar las inyecciones o extracciones de sangre que no sean realizadas con material desechable.
- Evitar los tatuajes, así como la acupuntura, que no se realicen con instrumental correctamente esterilizado.
- Evitar el uso de drogas por vía parenteral o en su defecto, utilizar material desechable o de uso individual.
- Evitar las relaciones homo y heterosexuales anónimas y promiscuas o en su caso utilizar preservativos.

Para los sujetos infectados se recomienda el uso personal de útiles de aseo, instrumentos que se puedan contaminar con sangre (maquinilla de afeitar, cepillos de dientes, etc.), higiene personal en aseo aparte, lavado de ropa independiente y en general, todas aquellas medidas que conlleven el máximo aislamiento posible de los mismos.

Para el personal sanitario, se recomienda extremar las medidas de precaución durante la asistencia a pacientes infectados y con la manipulación de material contaminado. Estas recomendaciones incluyen:

- Evitar heridas accidentales.
- Usar dos pares de guantes y batas protectoras desechables.
- Lavar enérgicamente las manos antes y después de toda manipulación.
- Introducir en un segundo recipiente, resistente e identificado de forma visible, todas las muestras contaminadas que deban ser transportadas.
- Usar lejía doméstica para las salpicaduras y manchas de sangre.
- Usar jeringas y agujas desechables. Estas últimas se depositarán, sin reencapsular, con el fin de evitar pinchazos, en contenedores resistentes e independientes.
- Usar mascarillas cuando se manipule en el laboratorio material contaminado, que nunca debe ser pipeteado con la boca.
- Esterilizar de forma adecuada todo el instrumental médico no desechable que vaya a erosionar o penetrar en la piel o las mucosas de los pacientes. Como métodos correctos de esterilización, se consideran el calor húmedo (autoclave) a 121 °C, durante 30 minutos y el calor seco (hornos y estufas) a 170° C, durante 60 minutos. El instrumental médico que no puede ser sometido a altas temperaturas, se esterilizará con óxido de etileno o glutaraldehído al 2 % durante 10 horas.

Las medidas generales comentadas hasta ahora no son suficientes por sí solas para prevenir la infección por el VHB en determinados grupos de población que presentan un

riesgo elevado de infección, por lo que en estos casos, se deben adoptar medidas de inmunoprofilaxis pasiva y/o activa.

Siguiendo las recomendaciones del Centers for Disease Control (93), para la inmunoprofilaxis pasiva se utiliza la inmunoglobulina antihepatitis B (HBIG), elaborada a partir del plasma de sujetos antiHBs positivos y que contiene títulos de este anticuerpo superiores a 1:100.000 (RIA).

La HBIG está indicada en la profilaxis postexposición, es decir, en la prevención de la infección por el VHB después de la exposición al virus en cualquiera de las situaciones siguientes:

- contacto accidental, a través de la piel o las mucosas, con sangre HBsAg positiva.
- contacto sexual con personas HBsAg positivas.
- contacto perinatal en niños nacidos de madres HBsAg positivas.

En las tres situaciones, la HBIG debe administrarse lo antes posible, a la dosis de 5 ml para los adultos (0,006 ml/Kg) y de 0,5 ml para los recién nacidos. En todos los casos se debe completar la profilaxis con la administración de la vacuna frente al VHB.

En las situaciones de preexposición, es decir, en las personas o colectivos que presentan un riesgo elevado de infección por el VHB, la HBIG no debe utilizarse, ya que se debería administrar una dosis cada mes para garantizar la protección permanente, lo cual es poco práctico, caro y no exento de riesgos. En estos casos, está indicada la inmunización activa por medio de la vacuna antihepatitis B. Los primeros estudios llevados a cabo para la obtención de la vacuna frente a la hepatitis B se iniciaron a principios de los años 70. Así, en el año 1971, Krugman (94), elaboró una primera vacuna, a partir de diluciones del suero obtenido de portadores crónicos del HBsAg, inactivado mediante ebullición y observó que la administración de esta vacuna rudimentaria protegía contra la infección o modificaba el curso clínico de la enfermedad, en el 70 % de los casos, tras la inoculación de suero infeccioso.

Este estudio proporcionó las bases para utilizar el suero de portadores del VHB en

la obtención de una vacuna inmunógena y protectora.

De esta forma, en el año 1976, Maupas (95) en Francia y Buynak (96) y Hilleman (97) en Estados Unidos, desarrollaron, de forma paralela, las vacunas derivadas del plasma humano, compuestas por partículas de HBsAg inactivadas y purificadas, conocidas como vacunas de primera generación, autorizándose su uso en Estados Unidos, en el año 1981.

El problema que presentaban estas vacunas, era su procedencia plasmática, que limitaba su producción y obligaba a una elaboración prolongada, para lograr la máxima seguridad y eficacia.

Por ello, se iniciaron otras líneas de investigación, basadas en técnicas de biotecnología. Así, mediante la recombinación del fragmento de DNA del VHB que codifica el HBsAg (Región S), en células procariotas y eucariotas, se obtuvieron, por secreción en el medio de cultivo, partículas de HBsAg similares a las encontradas en el plasma de los sujetos infectados. Para la producción de este tipo de vacunas, conocidas como vacunas de segunda generación, se han utilizado principalmente, levaduras (98) y células de mamíferos (99,100).

Finalmente, las vacunas de tercera generación, están basadas en la obtención de péptidos sintéticos, a partir de la secuencia exacta de la región S del DNA-VHB (101,102), y están en fase de experimentación vacunas que utilizan conjuntamente las regiones S y pre-S, del DNA-VHB (103), o el HBcAg (103).

En España, la adquisición, prescripción y dispensación de la vacuna antihepatitis B, se efectúa según lo establecido en el Real Decreto 3179/1983 del 23 de Noviembre (104), cuyo artículo 2º dice que sólo se recomendará la vacuna a las personas que pertenezcan a alguno de los siguientes grupos de riesgo, tras los informes clínicos, serológicos y epidemiológicos correspondientes:

- Enfermos sometidos a hemodiálisis o transfusiones periódicas.
- Personal que trabaje directamente en los servicios de hemodiálisis, análisis, quirúrgicos, dentales y laboratorios.

- Deficientes mentales ingresados en instituciones cerradas y personal que trabaje en ellas.
- Personal en contacto íntimo con portadores crónicos del virus de la hepatitis B.
- Personas que practiquen punciones cutáneas frecuentes no controladas médicamente (drogadictos etc.)
- En casos concretos donde concurren específicas circunstancias que lo aconsejen.

Por otra parte, para autorizar la adquisición de la vacuna, se exige un protocolo de prevacunación, en el que conste que el HBsAg, antiHBc y antiHBs son negativos.

La determinación de estos marcadores, antes de la vacunación, en los adultos y niños que no sean recién nacidos, es indispensable, para evitar inmunizaciones innecesarias en los casos en que exista evidencia de infección, presente o pasada, por el VHB. En el suero de los recién nacidos de madres portadoras, existe antiHBc-IgG, adquirido pasivamente por vía transplacentaria, y en ocasiones, HBsAg en sangre del cordón, que no contraindica la vacunación, sino que la hacen indispensable, y se debe vacunar lo antes posible tras el nacimiento.

En España hay actualmente disponibles tres vacunas distintas:

- vacuna plasmática (Merck Sharp Dohme) (HB-VAX)<sup>®</sup> , que se presenta en viales de 1 ml que contienen 20 ug de HBsAg.
- vacuna plasmática (Pasteur) (HEVAC-B)<sup>®</sup> , que se presenta en viales de 1 ml con 5 ug de HBsAg.
- vacuna recombinante de levadura (Smith-Kline & French) (Engerix-B)<sup>®</sup> , en viales de 1 ml con 20 ug de HBsAg.

Las tres vacunas se administran por vía intramuscular. En los adultos en la región deltoide y en los niños pequeños y recién nacidos, en el glúteo o zona anterolateral del muslo.

La vacuna Merck se administra en 3 dosis, de 20 ug cada una de ellas, en los adultos y niños mayores de 10 años, y de 10 ug en los recién nacidos y niños menores de 10 años.

La vacuna Pasteur se administra en 4 dosis, de 5 ug cada una, tanto en adultos, niños y recién nacidos.

La vacuna recombinante se administra en 3 dosis, para los adultos y niños, y 4 dosis para los recién nacidos, de 20 ug cada una de ellas.

Los intervalos utilizados, cuando se administran tres dosis, son de 0, 1 y 6 meses (pauta "americana"), y si se administran cuatro dosis, son de 0, 1, 2 y 12 meses (pauta "francesa").

Cualquiera de estas vacunas induce una respuesta de antiHBs, a un nivel protector, en el 92-97 % de las personas sanas e inmunológicamente normales, incluyendo a los recién nacidos.

La duración del efecto protector de la vacuna depende del título de antiHBs conseguido tras la vacunación. Se calcula que en la mayoría de las personas hay niveles de antiHBs protectores durante 3-5 años, debiendo administrarse una nueva dosis de vacuna cuando los niveles de antiHBs están por debajo del límite protector.

La seguridad de las vacunas antihepatitis B, tanto las de primera como de segunda generación, parece fuera de toda duda (105,107), y se ha demostrado que las vacunas de procedencia plasmática están exentas del cualquier germen infeccioso conocido, incluido el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (108).

Tan solo se han descrito reacciones locales en la zona de inyección, cefalea y febrícula, en menos del 20 % de las personas que han recibido la vacuna, tanto plasmática, como recombinante (109).

#### **I.10.- PREVENCIÓN DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VHB.**

La prevención de la transmisión vertical del VHB es posible y eficaz desde hace unos

años, siendo necesario para ello, identificar las mujeres gestantes HBsAg positivas mediante un "screening" de rutina que incluya a todas las mujeres embarazadas. El "screening" inicial puede consistir en la determinación del HBsAg o del antiHBc en suero. En cualquier caso, se debe llevar a cabo con la suficiente antelación para organizar y realizar la protección del recién nacido inmediatamente después del parto.

La prevención de la infección por el VHB en los hijos de madres HBsAg positivas puede ser realizada por inmunoprofilaxis pasiva y/o activa.

En los primeros estudios publicados (110-113), a principios de los años 80, sólo se administró HBIG al recién nacido y se vió que se podía evitar el estado de portador crónico del HBsAg hasta en el 75 % de los niños, durante el primer año de vida, siempre y cuando se administrase lo más precozmente posible y con sucesivas dosis durante los tres a seis primeros meses de vida.

Beasley (114,115), en 1981, inició en Taiwan un ensayo a doble ciego controlado con placebo para comprobar la eficacia de la HBIG en la prevención de la transmisión vertical del VHB, obteniendo niveles de protección del 71 %, cuando se administraban tres dosis de 0,5 ml cada una, a los 0, 3 y 6 meses de vida, y del 42 % cuando se administraba una sola dosis de 1,0 ml tras el nacimiento. También se observó que aproximadamente el 40 % de los niños tenían una inmunización "pasiva-activa", por la administración pasiva de anticuerpos y la producción activa de los mismos tras una infección subclínica.

Con la aparición de las vacunas plasmáticas en 1981, se realizaron estudios para comprobar su eficacia en la prevención de la transmisión vertical del VHB en Senegal y Sudeste Asiático (114-118), obteniéndose resultados similares a los encontrados tras la administración de dosis múltiples de HBIG.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios con diferentes pautas de vacunación (119-121), y combinando la HBIG con la vacuna antihepatitis B (65,122-130). Estos últimos han demostrado una eficacia protectora del 94-97 %, por lo que la inmunoprofilaxis combinada (pasiva y activa) es actualmente el mejor método y el que se recomienda en la prevención de la transmisión vertical, ya que protege al recién nacido, de forma inmediata y a largo plazo, de la infección por el VHB.

La inmunoprofilaxis debe iniciarse lo antes posible tras el nacimiento, con la administración de 0,5 ml de HBIG y la primera dosis de la vacuna, ambas por vía intramuscular, pero en lugares diferentes. La vacunación se continua a las dosis e intervalos indicados en cada caso, según el tipo de vacuna utilizada. Si la vacunación se retrasa, hay que seguir administrando 0,5 ml de HBIG mensualmente hasta que se inicie la profilaxis activa. (Tabla 2).

Se debe proteger a los niños nacidos de gestantes HBsAg positivas, por infección aguda o crónica, con independencia de la presencia en el suero de la madre del HBeAg, antiHBe o la ausencia de ambos marcadores.

La profilaxis del recién nacido al principio estaba condicionada a la presencia del HBsAg en sangre del cordón, de forma que se indicaba sólo cuando el HBsAg era negativo. Actualmente, se admite que la inmunoprofilaxis debe iniciarse aunque el HBsAg sea positivo en sangre del cordón, ya que puede deberse a contaminación con sangre materna, infección en el momento de parto o infección intraútero con replicación viral. En el primer caso, la profilaxis resulta eficaz, en el segundo, puede prevenir o modificar el curso de la enfermedad y en el tercero de los casos, no previene la enfermedad, pero tampoco resulta perjudicial para el niño (131).

La administración simultánea de vacuna antihepatitis B y las vacunas frente a la difteria, tétanos, tosferina y polio no interfieren en la producción de anticuerpos ni provoca reacciones anormales en los niños (132).

### **I.11.- VIRUS DE LA HEPATITIS C.**

Con el desarrollo de marcadores serológicos específicos para el VHA y el VHB, Feinstone (133) y Knodell (134), en el año 1975, observaron que la mayoría de los casos de hepatitis asociada a transfusión sanguínea o hepatitis post-transfusional (HPT), no podían ser atribuidos al VHA, VHB u otros virus hepatotropos, y ante la imposibilidad de identificar el agente o agentes que la producían, se la denominó hepatitis no-A, no-B (HNANB).

**TABLA 2**  
**INMUNOPROFILAXIS EN R.N. DE MADRES HBsAg POSITIVAS**

	VIA	DOSIS	Nº DOSIS	INTERVALOS
HBIG	IM	50 UI (0,5 ml)	.	.
VACUNAS DISPONIBLES:				
HB-VAX <sup>®</sup> (MSD)	IM	10 ug HBsAg	3	0-1-6 meses
HEVAC-B <sup>®</sup> (PASTEUR)	.	5 ug HBsAg	4	0-1-2-12 meses
ENGERIX-B <sup>®</sup> (SKF)	.	20 ug HBsAg	4	0-1-2-12 meses

. Repetir HBIG mensualmente si se retrasa la vacunación.

Actualmente se considera que la HNANB es responsable de más del 90 % de los casos de hepatitis post-transfusional, siendo transmitida principalmente por vía parenteral, a través de la sangre o productos sanguíneos contaminados, aunque, según Alter (135), también puede ser transmitida por otras vías (oral, sexual, cutánea, etc.)

Por otro lado, en un estudio prospectivo sobre la HNANB post-transfusional, llevado a cabo por Dienstag (136) en el año 1986, se indica que alrededor del 75 % de las infecciones agudas son subclínicas, que aproximadamente, la mitad de todas las infecciones cronifican y de éstas, alrededor del 20 % pueden evolucionar hacia una cirrosis hepática. Asimismo, en un trabajo llevado a cabo por Okuda (137) en el año 1984, se plantea que pueda existir una posible asociación entre la HNANB y el carcinoma hepatocelular primario.

Por todo lo dicho, la HNANB es, hoy día, una de las principales complicaciones de las transfusiones sanguíneas y un importante problema de salud pública en todo el mundo, lo que ha motivado, a lo largo de la última década, numerosos trabajos de investigación, centrados fundamentalmente en la identificación del agente que la produce y en la obtención de métodos de diagnóstico específicos para dicho proceso.

Como se ha citado, en los últimos años aparecen numerosos estudios que tratan de identificar la partícula vírica que produce la HNANB, cuya morfología se desconoce, aunque ha sido posible transmitir la infección a chimpancés. Dienstag (138), en el año 1983, indica que en algunos trabajos se utilizan estos animales como modelos para el estudio de la infección en humanos. Asimismo se ha comprobado que los solventes orgánicos destruyen la capacidad infectiva del agente vírico, porque desnaturalizan su cubierta lipídica. También se sabe que estos virus atraviesan filtros de un diámetro inferior a 80 nm. Todo lo anterior lleva a Bradley (139) a considerar que el agente responsable de la HNANB es un pequeño virus RNA, semejante a los de la familia de los togavirus. No obstante, la incapacidad para identificar antígenos específicos y ácidos nucleicos asociados al virus, hace que su verdadera naturaleza permanezca todavía en el terreno de la hipótesis.

Por otra parte, debido a la frecuencia y severidad de la HNANB, la necesidad de desarrollar métodos de diagnóstico específicos, ha sido cada vez más urgente. Así, después de múltiples intentos por estandarizar un método de detección del virus, como

el llevado a cabo en el año 1981 por Suh (140), en el año 1989, Choo y Kuo (141) han logrado clonar el genoma de un agente de la HNANB, denominado virus de la hepatitis C (VHC), y basándose en estos hallazgos, los citados autores (142) han desarrollado un enzima inmunoensayo específico para la determinación de anticuerpos circulantes frente al VHC.

Los estudios llevados a cabo a lo largo del año 1989, en diferentes países, por autores como Kuoy Choo (142), Esteban (143), van der Poel (144), Kühnl (145) y Roggendorf (146), indican que el VHC es la principal causa (y quizás la única), de HNANB post-transfusional, así como de la HNANB adquirida en la comunidad por exposición parenteral, o por otras vías de transmisión.

## **OBJETIVOS**

Existe un elevado número de sujetos portadores del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, cuya evolución clínica puede conducir a la cirrosis hepática y/o carcinoma hepatocelular primario. El estudio de estos sujetos y de los mecanismos de transmisión del virus es de una gran importancia sanitaria.

Los OBJETIVOS del presente trabajo son los siguientes:

- 1º) Determinar la prevalencia del virus de la hepatitis B en una población de mujeres embarazadas, procedentes de nuestro medio (Area del Hospital Universitario "Virgen Macarena").
- 2º) Estudio de los distintos mecanismos de transmisión del virus de la hepatitis B dentro del entorno familiar.
- 3º) Estudio de las medidas inmunoproliféricas adecuadas para disminuir o erradicar la transmisión del virus de la hepatitis B.

A finales de año 1989 aparecen trabajos que permiten la detección de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C. Con el fin de completar el estudio se añadió un nuevo objetivo como era observar la presencia de dichos anticuerpos en una parte de la población estudiada.

## **II.- MATERIAL Y METODOS**

## **II.1.- GESTANTES.**

Se han estudiado en la Unidad de Hepatología del Departamento de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario "Virgen Macarena", 2600 mujeres gestantes, remitidas desde las consultas externas del Departamento de Obstetricia y Ginecología de dicho Hospital y otros centros de su área asistencial, durante el periodo de tiempo comprendido entre el 1 de Enero de 1988 y el 30 de Junio de 1989.

Las mujeres estudiadas presentaban edades entre los 15 y 45 años, con una media de 26,7 años. Su distribución se hizo de la siguiente forma: el 14 % de las mujeres tenían de 15 a 20 años, el 29 % de 21 a 25 años, el 34 % de 26 a 30 años, el 16 % de 31 a 35 años, el 6 % de 36 a 40 años y el 1 % de 41 a 45 años. (Gráfica 1).

Asimismo, el 22 % de las mujeres se encontraban en el primer trimestre de gestación, el 50 % en el segundo y el 28 % en el último trimestre.

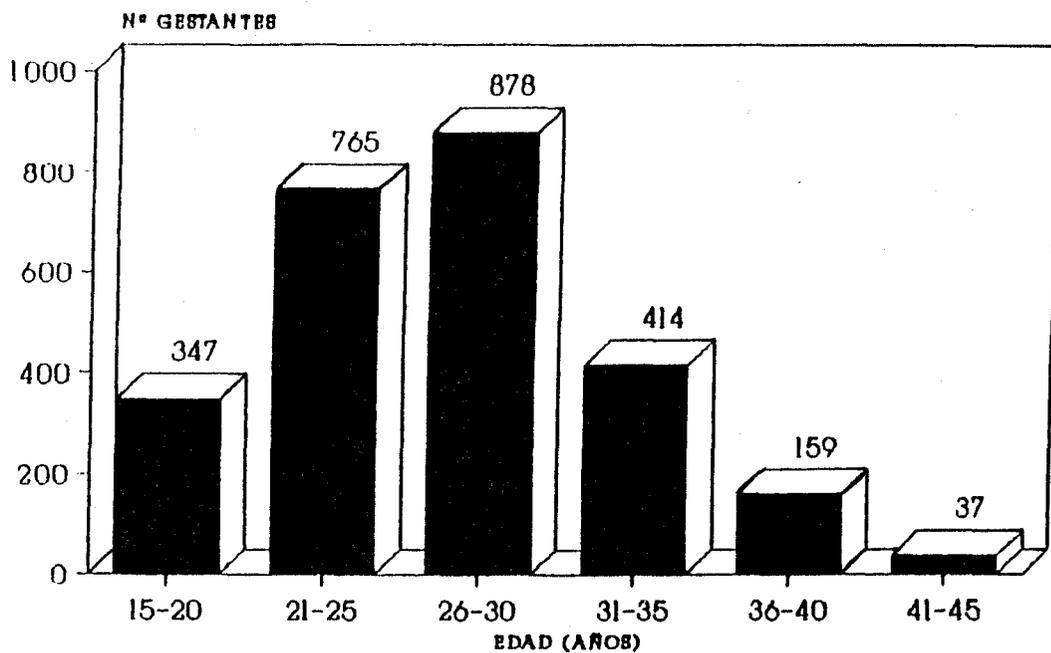
El 55 % de las mujeres residían en la ciudad de Sevilla y el 45 % en pueblos de su provincia.

## **II.2.- FAMILIARES.**

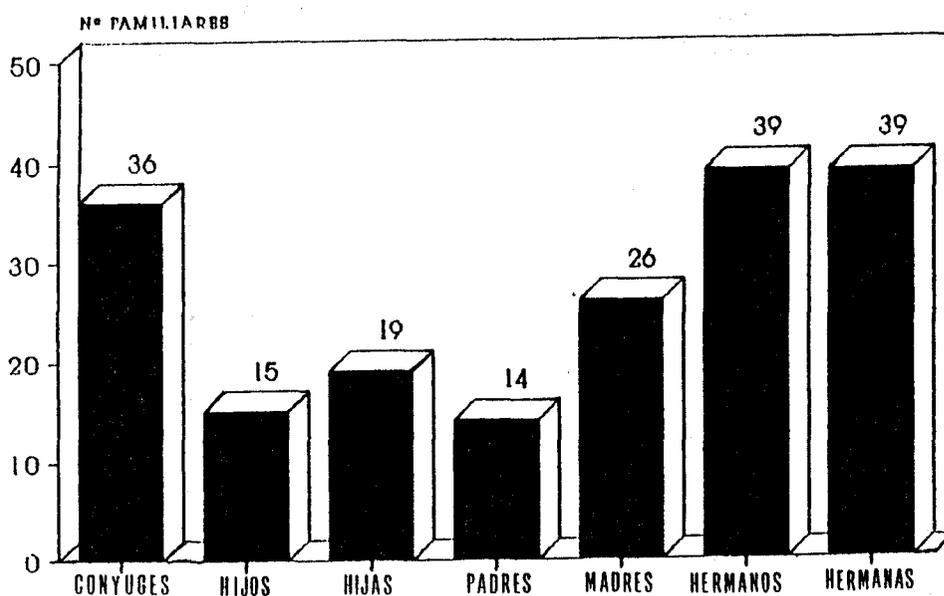
Se han estudiado en total a 188 familiares de mujeres portadoras crónicas del HBsAg, distribuidos de la siguiente forma: 36 cónyuges, 34 hijos (15 varones y 19 hembras), 40 padres (14 varones y 26 hembras), y 78 hermanos (39 varones y 39 hembras), con edades comprendidas entre los 9 meses y los 70 años, con una media de 29,4 años en el grupo de los cónyuges, 6,1 años en el grupo de los hijos, 57,5 años en el grupo de los padres y 25,8 años en el grupo de los hermanos. (Gráfica 2).

## **II.3.- SANGRE DEL CORDON.**

Se han obtenido un total de 32 muestras de sangre del cordón umbilical, de los niños nacidos de madres que eran portadoras crónicas del HBsAg. De estos niños, 18 fueron varones y 14 hembras.



**GRAFICA 1:** DISTRIBUCION POR EDADES DE LAS MUJERES GESTANTES ESTUDIADAS. (n=2600)



**GRAFICA 2:** FAMILIARES DE GESTANTES HBsAg POSITIVAS (n=188)

Todos los niños nacieron con peso adecuado y no presentaron ningún tipo de alteración, excepto uno que nació con el Síndrome de Down.

Todos los partos tuvieron lugar a término, excepto uno que fué a las 32 semanas de gestación. En cuatro ocasiones se tuvo que practicar cesárea.

#### **II.4.- MATERIAL DE LABORATORIO.**

- Ultracentrífuga, Mod. L5-HO (BECKMAN).
- Contador Gamma MULTI-CRYSTAL COUNTER LB 2104 (BERTHOLD).
- Contador LKB 1210 Ultrabeta.
- Autoanalizador Mod. CHEM 1 (TECHNICON).
- Rotor T-25 (BECKMAN).
- Microfuga (EPPENDORF).
- Espectrofotómetros: QUANTUM TM II (ABBOT), COBAS EIA (ROCHE) y AUTOREADER III (ORTHO).
- Incubadores y lavadores automáticos (ROCHE, ABBOT y ORTHO).
- Agitador Mischer 5432 (EPPENDORF).
- Material fungible.
- Material desechable.
- Centrífuga , Mod. Clino (ORTHO).

- PC-640 A turbo II, Mod. N° 14CH113 (INVES).
- Mezclador ATOMIXER (ATOM).
- Tubos de policarbonato de 1 ml, Ref. 342646 (BECKMAN).
- Filtros WHATMAN (grado 3).
- Tubos de centelleo (ATOM).
- Ficoll-Paque (PHARMACIA).
- Solución isotónica de cloruro de sodio al 0.9 % (PALEX).
- Sacarosa (Art. 7651, MERCK).
- Nonidet P-40 (N-6507, SIGMA).
- 2-Mercaptoetanol (Art. 805740, MERCK).
- TRIS (Hidroximetil)-aminometano (Art. 8382, MERCK).
- $\text{Cl}_2$  Mg (Art. 5833, MERCK).
- $\text{CINH}_4$  (Art. 1145, MERCK).
- Timidina- $\text{H}^3$  -5'-trifosfato (TRK-424, AMERSHAM).
- d-ATP (2'-desoxiadenosin-5'-trifosfato) (Ref. 6500, PM = 535,1 SIGMA).
- d-GTP (2'-desoxiguanosin-5'-trifosfato) (Ref. 4010, PM = 507,2 SIGMA).
- d-CTP (2'-desoxicitidin-5'-trifosfato) (Ref. 4635, PM = 467,2 SIGMA).
- TCA (ácido tricloroacético, Art. 807, MERCK).

- Pirofosfato sódico ( $P_2 O_2 Na_4$ , N-8010, SIGMA).
- Líquido de centelleo (Ref. 56920, KONTRON).
- DISOLUCION I: Tris-HCl 0,01 M, pH = 7,4.
- DISOLUCION II: 12,5 ul Nonidet P-40  
2 ml DISOLUCION I  
25 ul 2-mercaptoetanol
- DISOLUCION III: 900 ul Tris-HCl 0,01 M, pH = 7,1-7,2  
  
30 ul  $Cl_2$  Mg 0,02 M  
  
180 ul  $ClNH_4$ , 0,24 M  
  
300 ul Timidina tritiada (d-TTP- $H^3$ , 1 mCi/ml)  
  
30 ul d-ATP 0,5 mM  
  
30 ul d-GTP 0,5 mM  
  
30 ul d-CTP 0,5 mM
- DISOLUCION A: Sacarosa 30 % / DISOLUCION I

## II.5.- PROTOCOLO.

A finales del año 1987 se inició en la Unidad de Hepatología del Departamento de Bioquímica Clínica, el diseño del programa de transmisión horizontal y vertical del VHB, objeto de este estudio. Puestos en contacto con el Departamento de Obstetricia y Ginecología de nuestro Hospital y contando con su estrecha colaboración, se elaboró una ficha de petición para que acompañase y sirviese de identificación a cada muestra

de sangre venosa llegada al laboratorio para ser incluida dentro del programa citado.

En dicha ficha se hacía constar el nombre y apellidos de la gestante, edad, teléfono o dirección, tiempo de gestación, si había tenido historia antigua de hepatitis o si convivía o había convivido con enfermo hepático, médico que hacía la petición y centro de procedencia. (Figura 8).

Todas las peticiones, en el momento de su llegada, se registraban en un libro de entrada, asignándoseles un número de identificación y a continuación se elaboraba una copia de la ficha de petición, destinada a nuestro archivo.

Todas las muestras fueron procesadas por centrifugación y el suero se separó en tres alícuotas. Una de ellas era congelada a  $-80^{\circ}\text{C}$ , pasando a formar parte de la seroteca dispuesta a tal fin. Otra se utilizaba para la determinación de las aminotransferasas séricas (AST y ALT) y en la última alícuota se realizaba la determinación del anticuerpo total del core (antiHBc), utilizando este marcador como "screening" inicial. En función de los resultados encontrados en cada caso, se realizaron otras determinaciones, siguiendo siempre el siguiente esquema de trabajo (Figura 9):

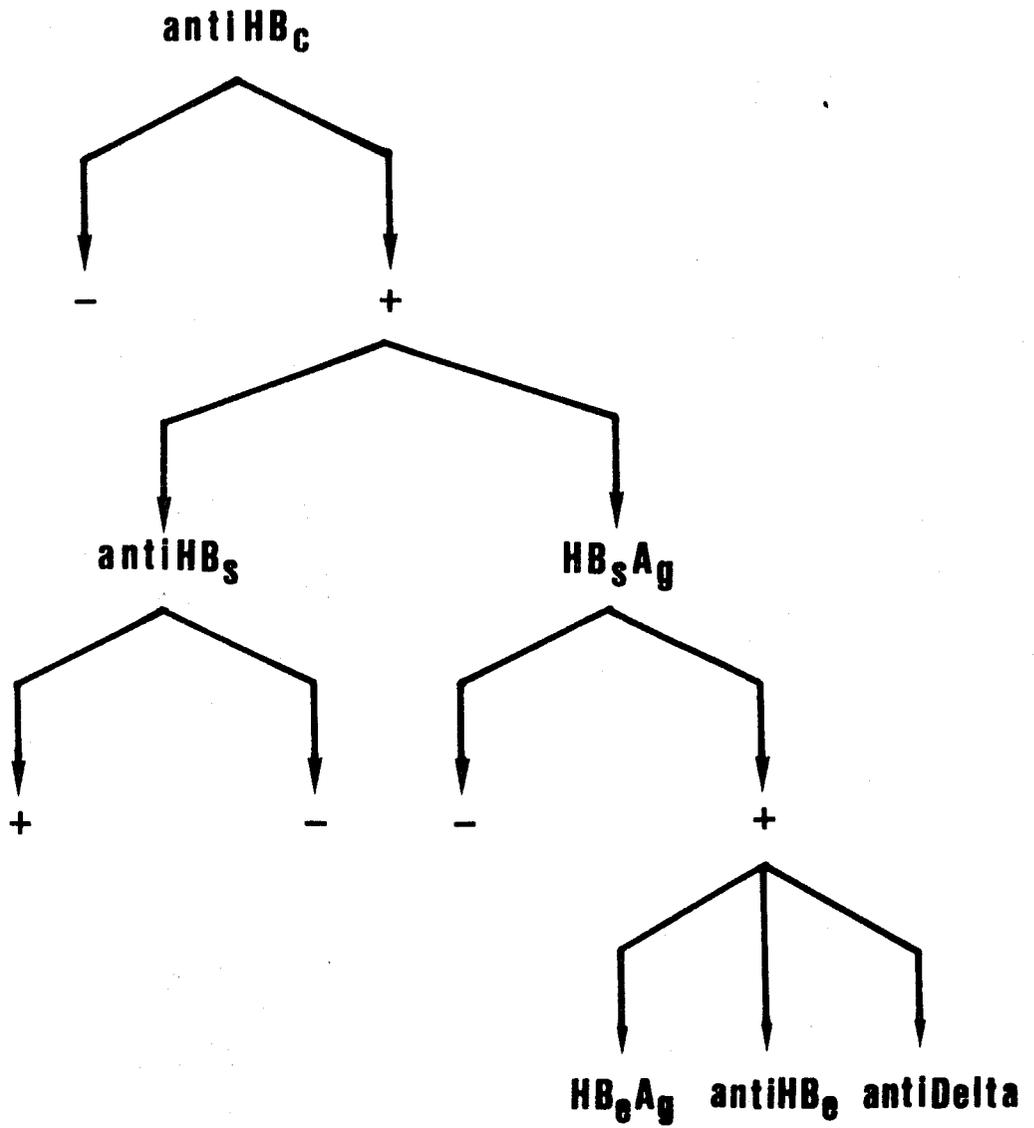
- Cuando el antiHBc era negativo en las muestras analizadas, no se realizaba ninguna otra determinación.
- Si el antiHBc era positivo, se procedía a la determinación del antígeno de superficie y su anticuerpo (HBsAg y antiHBs). Si ambos eran negativos, o si sólo era positivo el antiHBs, se finalizaba el estudio; si el HBsAg era positivo, se continuaba con la determinación del antígeno E de la hepatitis B, su anticuerpo y el anticuerpo frente al virus Delta (HBeAg, antiHBe y antiDelta)

En todos los casos se anotaron los resultados, tanto en la ficha de petición como en la copia. La ficha fué enviada al centro de procedencia y la copia archivada en el laboratorio.

Cuando se identificaba una gestante con el HBsAg positivo, nos poníamos en contacto con ella, concertando una primera cita en la que la mujer era informada de los análisis realizados y del contenido del programa que se estaba llevando a cabo. A

DR. _____ SERVICIO _____ FECHA _____ DE _____ 19____		<b>DPTO. DE BIOQUIMICA CLINICA</b>		1º APELLIDO _____ 2º APELLIDO _____ NOMBRE _____ EDAD _____	
<b>HOSPITAL UNIVERSITARIO - SEVILLA</b>	<u>A RELLENAR POR EL GINECOLOGO</u>			N° LABORATORIO _____	
	- HISTORIA ANTIGUA DE HEPATITIS - CONVIVE O HA CONVIVIDO CON ENFERMO HEPATICO			SI NO DUDA <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	TELEFONO _____ EDAD GEST. _____ SEMANAS _____
<u>RESULTADOS DE LABORATORIO</u>					
HB <sub>S</sub> AG _____ HB <sub>E</sub> AG _____ A <sub>C</sub> HB <sub>S</sub> _____ A <sub>C</sub> HB <sub>C</sub> _____ A <sub>C</sub> HB <sub>E</sub> _____  GOT _____ GPT _____					

**FIGURA 8:** Ficha de petición.



**FIGURA 9:** Esquema del "screening" para marcadores del virus de la hepatitis B en mujeres gestantes.

continuación se realizaba el estudio de las personas que convivían con ella (cónyuges e hijos) y de los familiares directos (padres y hermanos). En todos los casos se determinó en suero: AST, ALT, HBsAg, antiHBc y antiHBs. Si alguna persona era HBsAg positivo, también se determinaba el HBeAg, antiHBe y antiDelta.

A cada gestante HBsAg positiva se le extrajo una nueva muestra de sangre antes del parto (al menos una vez), obteniendo 10 ml de sangre coagulada mas 10 ml de sangre con heparina lio. Estos últimos se destinaban para la determinación de los antígenos del VHB en células mononucleares.

En el suero de las gestantes HBsAg positivas también se llevó a cabo la determinación de la actividad de la DNA-polimerasa (DNA-p) y el DNA del VHB (DNA-VHB).

En el momento de dar a luz se tomaron muestras de sangre del cordón, que una vez procesadas, y tras determinar el HBsAg, el antiHBc y antiHBs, se congelaban a - 80 °C.

Todos los niños recibieron el tratamiento profiláctico combinado (inmunización pasiva y activa) frente a la hepatitis B, con la administración de 0,5 ml de HBIG dentro de las primeras 24 horas tras el nacimiento y la primera dosis de la vacuna dentro de las 48 horas. Las sucesivas dosis de la vacuna, hasta un total de cuatro, les fueron administradas a los 1, 2 y 12 meses de edad, respectivamente.

Los cónyuges e hijos anteriores recibieron un total de tres dosis de la vacuna a los 0, 1 y 6 meses.

En todos los casos, al mes de haber recibido la última dosis de la vacuna, se investigó la presencia del anticuerpo frente al antígeno de superficie del VHB.

La vacuna antihepatitis B, utilizada actualmente en nuestro Hospital es la llamada Engerix-B®, obtenida por ingeniería genética por los laboratorios SK & F. Se presenta en forma de viales de 1 ml con 20 ug de HBsAg en cada uno de ellos. Su prescripción y dispensación se ha efectuado según lo establecido por el Real Decreto 3179/1983 del 23 de Noviembre (104).

## **II.6.- AISLAMIENTO DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA.**

Partiendo de 10 ml de sangre con heparina - litio, se centrifugan a 500xg durante 10 min. Se extrae el plasma con pipeta Pasteur y se reconstituye el volumen con solución salina. En dos tubos de plástico, en los que previamente se han echado 2,5 ml de Ficoll-Paque (PHARMACIA), se añaden 5 ml de sangre diluida, en cada tubo, con cuidado de no romper la interfase ficoll-sangre.

Los tubos se centrifugan a 400xg durante 20 minutos. Una vez centrifugados, aparece en la zona central de cada tubo un anillo denso, donde se encuentran las células mononucleares, que son extraídas con pipeta Pasteur. Se lavan tres veces, por centrifugación (400xg, 5 minutos), con 10 ml de solución salina, en cada uno de los lavados. A continuación se lisan las células por congelación-descongelación en medio hipotónico (0,5 ml de agua destilada). Finalmente se añaden 0,5 ml de solución salina y el lisado de células mononucleares queda preparado para la determinación de los antígenos del virus de la hepatitis B por los métodos de enzima inmunoensayo que se describen más adelante.

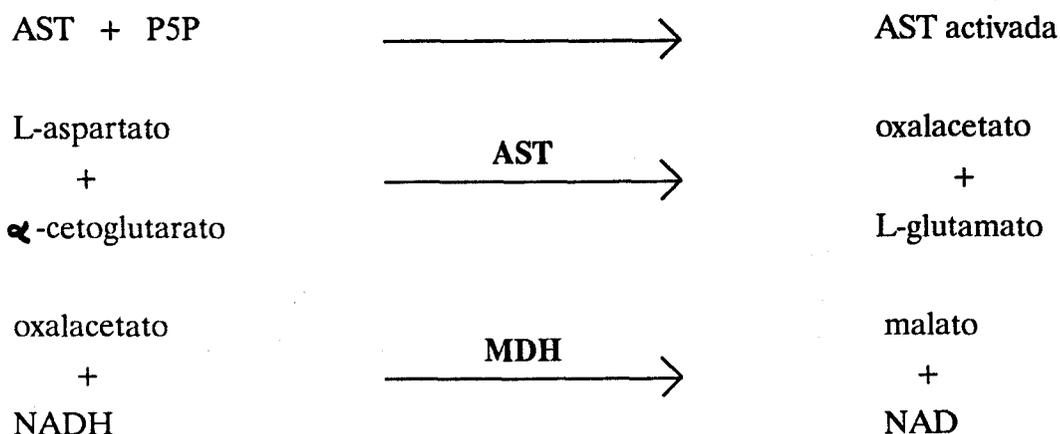
## **II.7.- ACTIVIDAD DE LAS AMINOTRANSFERASAS SERICAS.**

### **II.7.1.- Aspartatoaminotransferasa (AST) (EC 2.6.1.1.).**

La AST es una enzima que se encuentra en muchos órganos, pero que desde el punto de vista clínico tiene gran interés en el estudio de las hepatopatías de cualquier etiología. En el hígado se encuentra en el hepatocito y su actividad es mitocondrial (70 %) y citoplasmática (30 %).

La actividad de la AST se ha determinado en un autoanalizador de flujo discreto, de alta velocidad, modelo CHEM 1 (TECHNICON), según el método de Karmen (147), modificado por Bergmeyer (148) y siguiendo las recomendaciones de la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) (149).

La secuencia de las reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la determinación de la actividad de la AST se inicia al añadir el sustrato a una muestra de suero previamente incubada con fosfato de piridoxal (P5P) a 37°C:



La actividad de la AST es directamente proporcional a la velocidad con que disminuye la concentración de NADH, cuya absorbancia es medida y la concentración calculada utilizando su coeficiente de extinción molar.

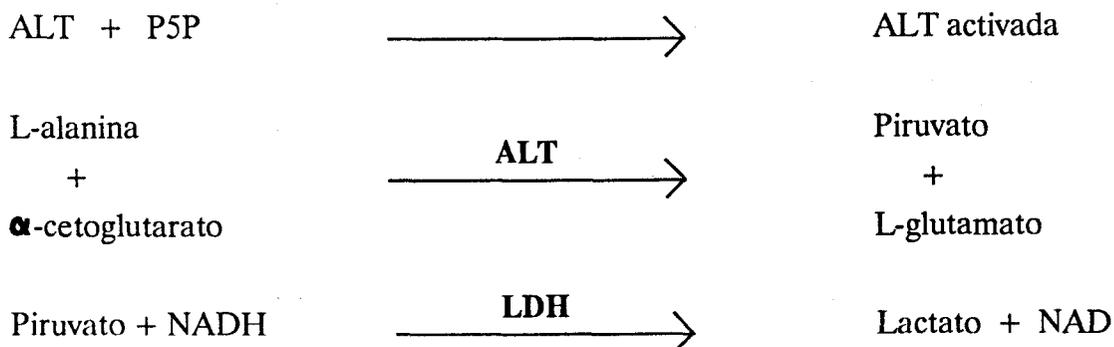
Los valores de referencia para este método se sitúan entre 6-45 U/L a 37°C.

### II.7.2.- Alaninoaminotransferasa (ALT) (EC 2.6.1.2).

La ALT se puede considerar, desde el punto de vista clínico, una enzima hepato-específica, porque el 90 % de su actividad se encuentra en el hígado y concretamente en el citoplasma del hepatocito. Se altera en cualquier tipo de hepatopatía, y su determinación es, hasta ahora, insustituible para determinar el grado de citolisis.

La actividad de la ALT se determinó en un autoanalizador de flujo discreto, de alta velocidad, modelo CHEM 1 (TECHNICON), según el método de Wroblewski y LaDue (150), modificado por Bergmeyer (148) y siguiendo las recomendaciones de la IFCC (151).

La secuencia de reacciones enzimáticas que tienen lugar durante la determinación de la actividad de la ALT se inicia al añadir el sustrato a una muestra de suero previamente incubada con fosfato de piridoxal (P5P) a 37°C:



Al igual que en la determinación de la actividad de la AST, la actividad de la ALT es directamente proporcional a la velocidad con que disminuye la concentración del NADH.

Los valores de referencia por este método se encuentran comprendidos entre 7-60 U/L.

## **II.8.- ENZIMAINMUNOENSAYO PARA LOS MARCADORES DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B.**

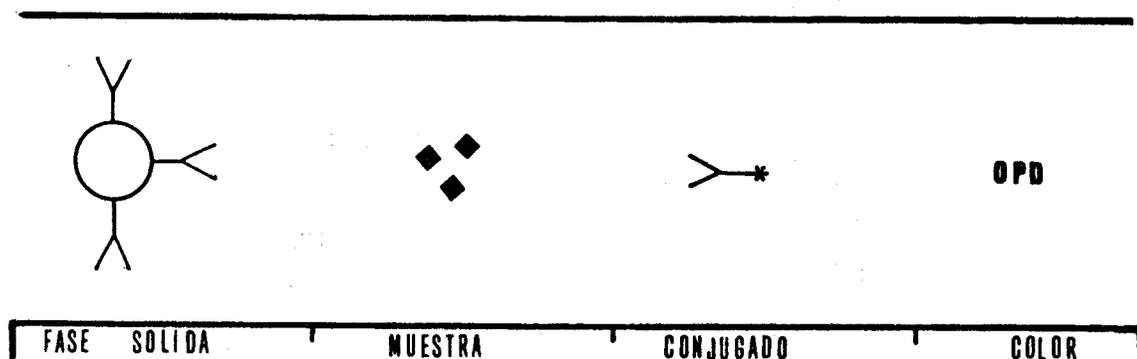
### **II.8.1.- Antígeno de superficie (HBsAg)**

Se ha utilizado un método de enzimmunoensayo en fase sólida (HBsAg EIA “Roche”)®, basado en el principio “sandwich”.

Todas las muestras (suero, plasma o lisado de células mononucleares), son incubadas, en un solo paso, con una esfera cargada de anticuerpos monoclonales de ratón (antiHBs) y anticuerpos policlonales de cabra (antiHBs), marcados con peroxidasa.

El conjugado de antiHBs-peroxidasa se une al HBsAg acumulado en la superficie de

la esfera. Tras lavar para eliminar la parte del conjugado que no ha reaccionado, se incuban las esferas con el sustrato enzimático (o-fenilendiamina). El color que adquieren es proporcional a la cantidad de conjugado de antiHBs-peroxidasa ligado, y por tanto, proporcional al HBsAg presente en la muestra. Posteriormente, se determina la intensidad del color y se compara con la de las muestras control, positivas y negativas, analizadas paralelamente.



## PROCEDIMIENTO

Pipetear

0,2 ml de muestra o control (tres controles negativos y uno positivo) a los tubos de ensayo, y agregar

0,1 ml de solución peroxidasa-antiHBs.

Introducir

1 esfera cargada de anticuerpos antiHBs, en cada tubo de ensayo.

Incubar los tubos, tapados con lámina autoadhesiva, durante 1 hora a 37°C.

Lavar tres veces los tubos de ensayo con agua destilada.

Preparar solución sustrato, disolviendo

1 compr. de o-fenilendiamina en

5 ml de tampón sustrato, por cada 19 tubos de ensayo utilizados.

Añadir a cada tubo

0,25 ml de solución sustrato.

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y en la oscuridad.

Para detener la reacción enzimática, añadir

1 ml de ácido sulfúrico 1N a cada tubo.

Medir en un fotómetro a 492 nm las absorbancias frente a un blanco.

## **CALCULO DE LOS RESULTADOS**

Hallar el valor medio de los controles negativos y sumarle 0,05 para calcular el valor límite.

Las muestras con valores de absorbancia por debajo del valor límite se consideran negativas y por encima del mismo, positivas para el HBsAg.

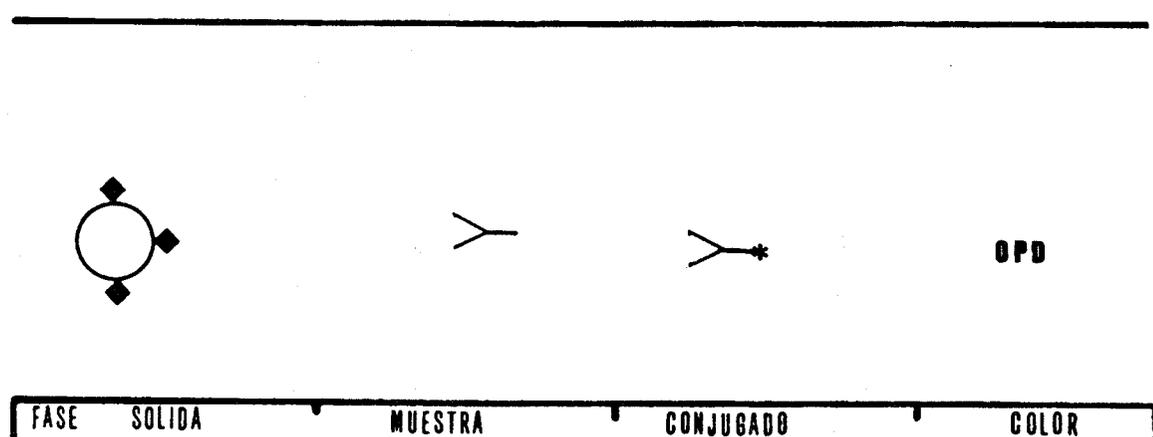
### **II.8.2.- Anticuerpo total del Core (antiHBc).**

Para determinar los anticuerpos dirigidos contra el antígeno del core de la hepatitis B (HBcAg), se ha utilizado un método de enzaimmunoensayo en fase sólida (Anti-HBc EIA “Roche”)® , de tipo competitivo.

Las esferas cargadas de HBcAg, producido por recombinación genética, por Burrell (152) y Stahl (153), se incuban con suero o plasma y peroxidasa-antiHBc. La

presencia de anticuerpos antiHBc en la muestra impide la fijación de peroxidasa-antiHBc a las esferas.

Tras el lavado para eliminar la parte de conjugado que no ha reaccionado, se incuban las esferas con el sustrato enzimático. El color que adquieren es proporcional a la cantidad de peroxidasa-antiHBc ligada. Después del cese de la reacción enzimática, se mide la absorbancia en un fotómetro a 492 nm y se compara con la de las muestras control, positivas y negativas, analizadas paralelamente.



### PROCEDIMIENTO

Pipetear

0,05 ml de muestra o control (tres controles negativos y uno positivo) a los tubos de ensayo, y agregar

0,25 ml de solución peroxidasa-antiHBc.

Introducir

1 esfera cargada de rHBcAg, en cada tubo de ensayo.

Tapar los tubos con lámina autoadhesiva e incubar durante 1 hora a 37°C.

Lavar tres veces los tubos de ensayo con agua destilada.

Preparar la solución sustrato disolviendo completamente

1 compr. de o-fenilendiamina en

5 ml de tampón sustrato, por cada 19 tubos de ensayo utilizados.

Añadir a cada tubo

0,25 ml de solución sustrato.

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y en la oscuridad.

Para detener la reacción enzimática, añadir

1 ml de ácido sulfúrico 1N, a cada tubo.

Medir en en fotómetro a 492 nm las absorbancias frente a un blanco.

### CALCULO DE LOS RESULTADOS

Comparar la absorbancia de las muestras con un valor límite, calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{valor límite} = (a \times \overline{\text{CN}}) + (b \times \text{CP}) + c$$

$\overline{\text{CN}}$  = media de los controles negativos.

CP = control positivo.

$$a = 0,3$$

$$b = 0,7$$

$$c = 0,0$$

El  $\pm 10\%$  del valor límite establece una zona de dispersión, de forma que las muestras de reacción débil y cuyas absorbancias se encuentren en dicha zona, deberán ser sometidas a una nueva determinación.

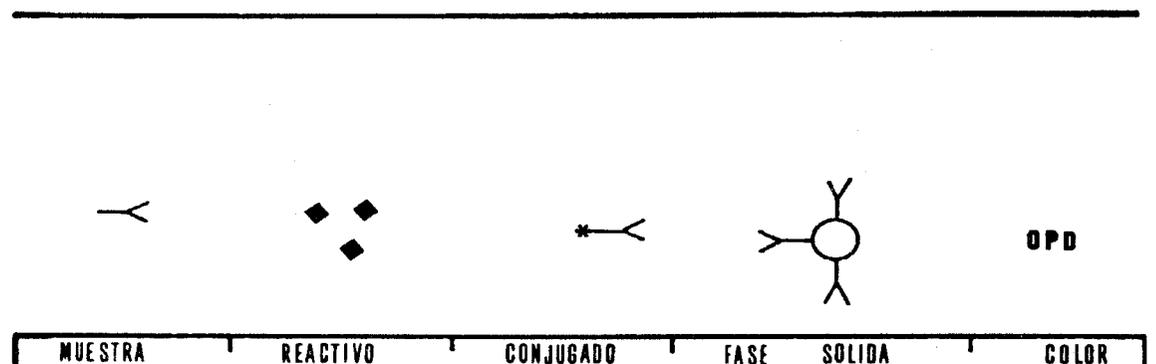
Aquellas muestras con absorbancias superiores al valor límite, se consideran negativas y si son inferiores, positivas.

### II.8.3.- Anticuerpo de superficie (antiHBs).

Para determinar los anticuerpos dirigidos contra el antígeno de superficie del VHB (antiHBs), se ha utilizado un método de enzaimnunoensayo en fase sólida (Anti-HBs EIA "Roche")<sup>®</sup>, basado en el principio de la neutralización, descrito por Wolters (154) y Zanetti (155).

Las muestras de suero o plasma se incuban con el reactivo HBsAg. Después de la incubación, se añade una solución de peroxidasa-antiHBs y una esfera cargada de anticuerpos antiHBs (monoclonales), para determinar la cantidad de HBsAg no ligado. Tras el lavado para eliminar los reactivos no ligados, se incuban las esferas con el sustrato enzimático; el color que adquieren es proporcional a la cantidad de peroxidasa-antiHBs ligada. Tras el cese de la reacción enzimática se mide la absorbancia en un fotómetro a 492 nm y se compara con la de las muestras control, positivas y negativas, analizadas paralelamente.

Cuanto mayor es la cantidad de anticuerpos antiHBs presentes en la muestra, tanto menor será la absorbancia.



## PROCEDIMIENTO

Pipetear

0,2 ml de muestra o control (tres controles negativos y uno positivo) a los tubos de ensayo, y agregar

0,02 ml de reactivo HBsAg.

Incubar los tubos, tapados con una lámina autoadhesiva, durante 1 hora a 37°C.

Pipetear

0,1 ml de solución peroxidasa-antiHBs, a todos los tubos de ensayo, y agregar

1 esfera cargada de anticuerpos antiHBs.

Incubar los tubos, tapados con lámina autoadhesiva, durante 1 hora a 37°C.

Lavar tres veces los tubos de ensayo con agua destilada.

Preparar solución sustrato, disolviendo completamente

1 compr. de o-fenilendiamina en

5 ml de tampón sustrato, por cada 19 tubos de ensayo utilizados. Añadir a cada tubo

0,25 ml de solución sustrato.

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y en la oscuridad.

Para detener la reacción enzimática, añadir

1 ml de ácido sulfúrico 1N a cada tubo.

Medir en un fotómetro a 492 nm las absorbancias frente a un blanco (0,25 ml de solución sustrato + 1 ml de ácido sulfúrico).

### **CALCULO DE RESULTADOS**

Comparar la absorbancia de las muestras con un valor límite calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{valor límite} = (a \times \overline{\text{CN}}) + (b \times \text{CP}) + c$$

$\overline{\text{CN}}$  = media de los controles negativos

CP = control positivo

$$a = 0,5$$

$$b = 0,5$$

$$c = 0,0$$

El  $\pm 10 \%$  del valor límite, establece una zona de dispersión, de forma que las muestras cuyas absorbancias se encuentren en dicha zona, deberán ser sometidas a una nueva determinación.

Las muestras con absorbancias superiores al valor límite se consideran negativas y si son inferiores, positivas.

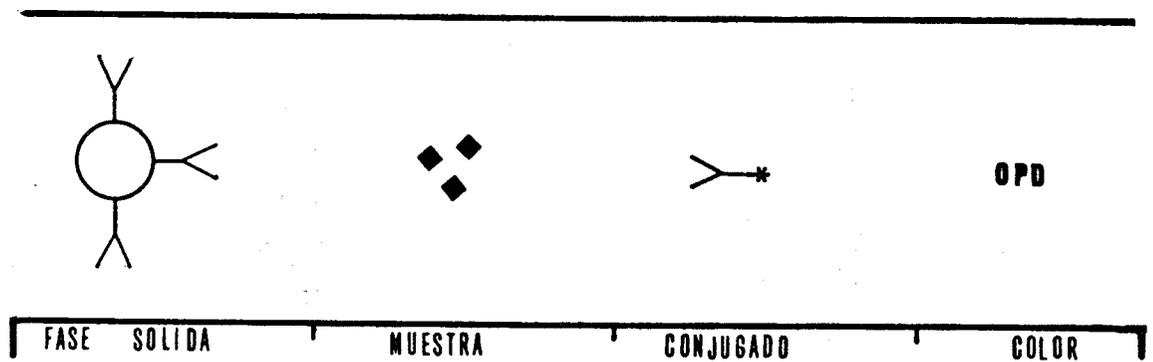
#### **II.8.4.- Antígeno E de la hepatitis B (HBeAg).**

Se ha utilizado un método de enzimmunoensayo en fase sólida (HBeAg EIA “Roche”)®, basado en el principio “sandwich”.

Todas las muestras (suero, plasma o lisado de células mononucleares), son incubadas en un solo paso, con una esfera cargada de anticuerpos monoclonales de ratón

(antiHBe) y con anticuerpos antiHBe marcados con peroxidasa.

El conjugado de antiHBe-peroxidasa se une al HBeAg acumulado en la superficie de la esfera. Tras lavar para eliminar la parte del conjugado que no ha reaccionado, se incuban las esferas con el sustrato enzimático (o-fenilendiamina). El color que adquieren es proporcional a la cantidad de conjugado de antiHBe-peroxidasa ligado, y por tanto, proporcional al HBeAg ligado. Posteriormente, se determina la intensidad de color y se compara con la de las muestras control, analizadas paralelamente.



### PROCEDIMIENTO

Pipetear

0,2 ml de muestra o control (tres controles negativos y uno positivo) a los tubos de ensayo, y agregar

0,1 ml de solución peroxidasa-antiHBe.

Introducir

1 esfera cargada de anticuerpos antiHBe, en cada tubo de ensayo.

Incubar los tubos, tapados con lámina autoadhesiva, durante 2 horas a 37°C.

Lavar tres veces los tubos de ensayo con agua destilada.

Preparar solución sustrato, disolviendo completamente

1 compr. de o-fenilendiamina en

5 ml de tampón sustrato, por cada 19 tubos de ensayo utilizados.

Añadir a cada tubo

0,25 ml de solución sustrato.

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y en la oscuridad.

Para detener la reacción enzimática,

añadir

1 ml de ácido sulfúrico 1N a cada tubo.

Medir en un fotómetro a 492 nm las absorbancias frente a un blanco.

### **CALCULO DE LOS RESULTADOS**

Hallar el valor medio de los controles negativos y sumarle 0,05 para calcular el valor límite.

Las muestras con valores de absorbancia inferiores al valor límite se consideran negativas y si son superiores, positivas.

#### **II.8.5.- Anticuerpo E de la hepatitis B (antiHBe).**

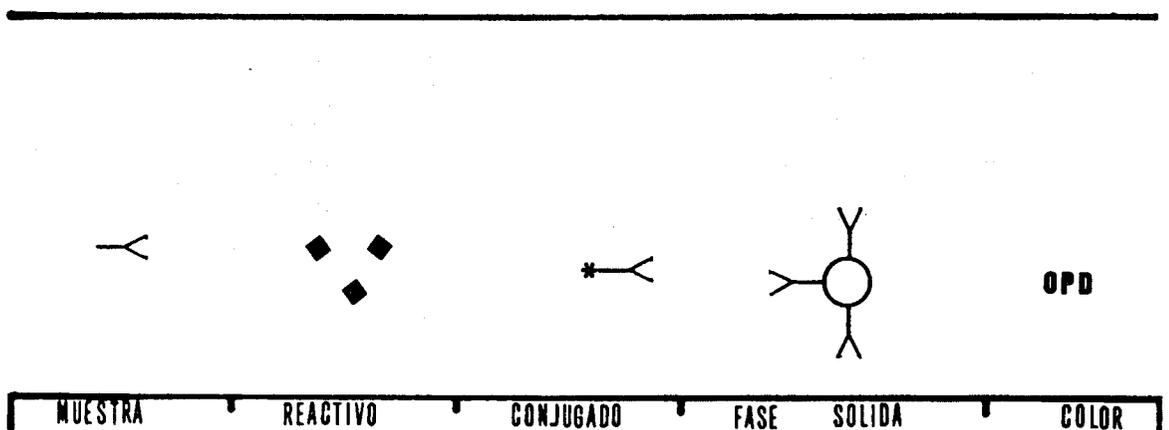
Para determinar los anticuerpos dirigidos contra el antígeno e de la hepatitis B (antiHBe), se ha utilizado un método de enzaimmunoensayo en fase sólida (AntiHBe

EIA "Roche")<sup>®</sup> , basado en el principio de la neutralización.

Las muestras de suero o plasma se incuban con el reactivo HBeAg, solución de peroxidasa-antiHBe y una esfera cargada de anticuerpos antiHBe (monoclonales), para determinar la cantidad de HBeAg no ligado.

Tras el lavado, se incuban las esferas con el sustrato enzimático. El color que adquieren es proporcional a la cantidad de peroxidasa-antiHBe ligado. Tras el cese de la reacción enzimática se mide la absorbancia en un fotómetro a 492 nm y se compara con la de las muestras control, positivas y negativas, analizadas paralelamente.

Cuanto mayor sea la cantidad de anticuerpos antiHBe presentes en la muestra, tanto menor será la absorbancia.



### PROCEDIMIENTO

Pipetear

0,05 ml de muestra o control (tres controles negativos y uno positivo) a los tubos de ensayo, y agregar

0,1 ml de reactivo HBeAg.

Añadir

1 esfera cargada de anticuerpos antiHBe a todos los tubos del ensayo. Incubar los tubos, tapados con lámina autoadhesiva, durante 2 h. a 37°C.

Lavar tres veces los tubos de ensayo con agua destilada.

Preparar solución sustrato, disolviendo completamente

1 compr. de o-fenilendiamina en

5 ml de tampón sustrato.

Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos y en la oscuridad.

Para detener la reacción enzimática, añadir

1 ml de ácido sulfúrico 1N a cada tubo.

Medir en un fotómetro a 492 nm las absorbancias frente a un blanco.

### CALCULO DE RESULTADOS

Comparar la absorbancia de las muestras con un valor límite calculado según la siguiente fórmula:

$$\text{valor límite} = (a \times \overline{\text{CN}}) + (b \times \text{CP}) + c$$

$$\overline{\text{CN}} = \text{media de los controles negativos}$$

$$\text{CP} = \text{control positivo}$$

$$a = 0,5$$

$$b = 0,5$$

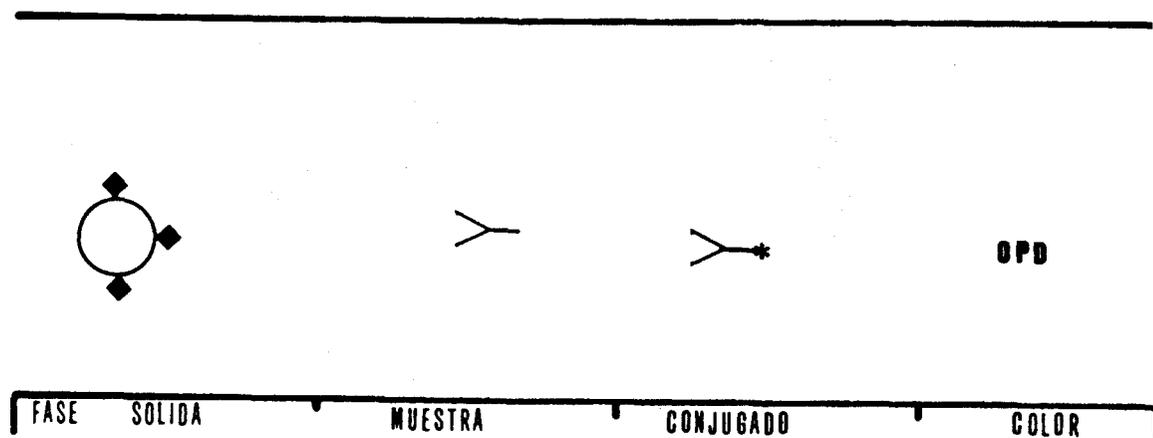
$$c = 0,0$$

El  $\pm 10\%$  del valor límite, establece una zona de dispersión, de forma que las muestras cuyas absorbancias se encuentren en dicha zona deberán ser sometidas a una nueva determinación.

Las muestras cuyas absorbancias sean superiores al valor límite se consideran negativas, y si son inferiores, positivas.

#### **II.8.6.- Anticuerpo frente al Antígeno de la Hepatitis Delta (antiDelta).**

Se ha determinado el antiDelta en suero o plasma mediante un método de enzimmunoensayo de tipo competitivo (ABBOTT ANTI-DELTA EIA Diagnostic Kit)<sup>®</sup>, en el cual, esferas recubiertas con el antígeno delta, se incuban con la muestra y con antiDelta conjugado con peroxidasa. Después de la incubación, el material no unido se elimina lavando las esferas. El antiDelta presente en la muestra, competirá con el conjugado antiDelta-peroxidasa. A continuación, se agrega a la esfera una solución de o-fenilendiamina (OPD), que contiene peróxido de hidrógeno. La reacción enzimática se suspende agregando 1 ml de ácido sulfúrico 1N. Posteriormente, se mide la absorbancia en un fotómetro a 492 nm.



#### **PROCEDIMIENTO**

Pipetear

0,1 ml de la muestra o control (tres controles negativos y dos controles positivos), y agregar

0,1 ml de solución antiDelta-peroxidasa.

Añadir

1 esfera cargada de antígeno Delta.

Incubar a temperatura ambiente durante 18-22 horas.

Lavar tres veces con agua destilada.

Preparar el sustrato enzimático, disolviendo

1 compr. de o-fenilendiamina en

5 ml de diluyente.

Añadir

0,3 ml de sustrato enzimático. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.

Parar la reacción enzimática, añadiendo

1 ml de ácido sulfúrico 1N a cada tubo.

Medir la absorbancia a 492 nm.

### **CALCULO DE RESULTADOS**

Se compara la absorbancia de la muestra con un valor límite o "cutoff". Este valor límite se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{valor límite} = 0,4(\overline{\text{CN}}) + 0,6(\overline{\text{CP}})$$

$\overline{\text{CN}}$  = media de los controles negativos

$\overline{\text{CP}}$  = media de los controles positivos

Las muestras con valores de absorción inferiores o iguales al valor límite se consideran positivas.

Las muestras con valores de absorción superiores al valor límite se consideran negativas.

## **II.9.- ENZIMAINMUNOENSAYO PARA EL VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)**

### **II.9.1.- Anticuerpos frente al VHC (antiVHC)**

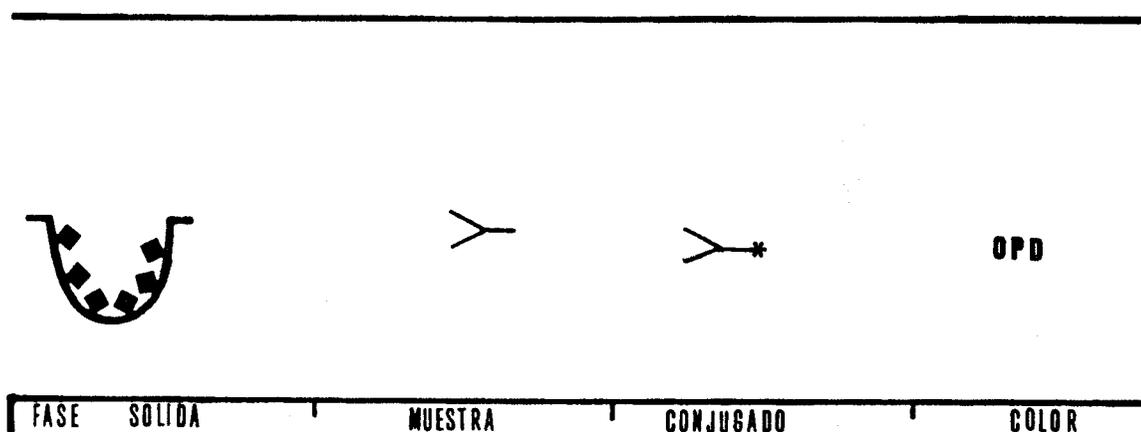
El ensayo consiste en una prueba de tres fases, realizada en un pocillo recubierto del antígeno recombinante del VHC (rVHC). (ORTHO HCV Antibody ELISA Test System)<sup>®</sup>.

En la primera fase, la muestra a estudiar, se diluye directamente en el pocillo y se incuba durante un tiempo determinado. Si hay antiVHC en la muestra, se formarán complejos antígeno-anticuerpo en la superficie del pocillo. Si el antiVHC no está presente, no se formarán tales complejos y las proteínas sin fijar, del suero o plasma sanguíneo, serán eliminadas en el lavado.

En la segunda fase, se añade al pocillo un conjugado de anticuerpo monoclonal murino. El conjugado se fija específicamente a la porción antiVHC de los complejos antígeno-anticuerpo. Si éstos no se hallan presentes, el conjugado sin fijar se eliminará en el lavado.

En la tercera fase, se agrega al pocillo del ensayo un sistema de detección enzimático, consistente en OPD y peróxido de hidrógeno. En presencia del conjugado fijado, la OPD

se oxida, dando como resultado un producto final coloreado. Seguidamente, se añade ácido sulfúrico para detener la reacción. La intensidad del color depende de la cantidad de conjugado fijado y es por consiguiente función de la concentración del antiVHC presente en la muestra.



### PROCEDIMIENTO

Colocar las tiras de pocillos necesarias en el portatiras.

Añadir

0,2 ml de diluyente a todos los pocillos.

Agregar

0,02 ml de los controles (tres controles negativos y dos controles positivos) y de las muestras a estudiar, en los pocillos correspondientes.

Colocar el portatiras en un agitador de placas, para que se mezclen durante 5-10 segundos.

Cubrir el portatiras con una tapa e incubar a 37°C durante 1 hora.

Lavar cinco veces todos los pocillos con PBS-polisorbato.

Añadir

0,2 ml del conjugado a todos los pocillos.

Cubrir el portatiras con una tapa e incubar a 37°C durante 1 hora.

Lavar los pocillos cinco veces con PBS-polisorbato.

Añadir

0,2 ml de solución sustrato (1 tableta de OPD en 6 ml de buffer sustrato, por cada 24 pocillos utilizados), a todos los pocillos.

Incubar en la oscuridad y a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

Agregar

0,05 ml de ácido sulfúrico 4N a todos los pocillos.

Proceder a la lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 492 nm.

### CALCULO DE RESULTADOS

$$\text{valor límite} = \overline{\text{CN}} + 0,4$$

$$(\overline{\text{CN}} = \text{media de los controles negativos})$$

Las muestras con valores de absorbancia inferiores al valor límite se consideran negativas (no reactivas), y no se requieren más pruebas.

Las muestras con valores de absorbancia superiores o iguales al valor límite se consideran inicialmente reactivas y deben repetirse, por duplicado, antes de su interpretación definitiva.

La muestra se considera definitivamente reactiva, si una de las dos determinaciones por duplicado o ambas, son reactivas a su vez, pero si las dos determinaciones son negativas, la muestra se considera definitivamente no reactiva.

## **II.10.- DETERMINACION DEL DNA-VHB.**

Para la determinación del DNA-VHB en suero, se utilizó un test radiológico de hibridación molecular (ABBOTT Genostics Hepatitis B DNA viral)<sup>®</sup> .

### **FUNDAMENTO.**

Se trata de un ensayo de “hibridación molecular en fase líquida”. Las muestras y controles se tratan para solubilizar y exponer el genoma del virus de la hepatitis B. Luego, se añade una sonda de DNA marcada con I<sup>125</sup> y se deja incubar toda la noche para permitir la hibridación del DNA del VHB procedente de la muestra. La mezcla se carga después en una columna y se la deja penetrar en la matriz de ésta, agregando a continuación un volumen fijo de tampón de dilución. Las moléculas híbridas son eluidas en este sistema, mientras que la sonda de DNA no hibridada es retenida en la columna. El material eluido se recolecta en un tubo y se lee seguidamente en un contador gamma.

Las muestras con tasas de contaje iguales o superiores al valor límite calculado se consideran positivas para el DNA del virus de la hepatitis B.

### **PROCEDIMIENTO.**

Resuspender la matriz-gel de todas las columnas, usando una varilla estéril de acero inoxidable, unas 18-24 horas antes del uso. Dejarlas reposar después, en posición vertical.

Pipetear

0,1 ml de cada muestra o control (tres controles negativos y dos controles positivos) en un tubo de reacción.

Agregar

0,1 ml del reactivo 1 y añadir

0,01 ml del reactivo 2. Tapar los tubos y agitar vigorosamente, centrifugándoles a continuación durante 1-3 segundos en una microcentrífuga.

Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.

Pipetear

0,02 ml del reactivo 3 a cada tubo, taparlos y agitarlos de nuevo, a fin de conseguir una mezcla adecuada. Incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Mientras tanto, calentar el reactivo 4 a 65°C durante un minuto, agitarlo e introducirlo en un baño de agua hirviente 5 minutos, dejándolo después a temperatura ambiente otros 5-10 minutos antes de su uso.

Pipetear

0,07 ml del reactivo 4, ya preparado, a cada tubo de reacción. Tapar todos los tubos, mezclarlos bien e incubarlos a 65°C durante 16-18 horas. Transcurridas éstas, centrifugar durante 1-3 segundos para eliminar la condensación en la parte superior de los tubos.

Pipetear

0,3 ml del contenido de cada tubo de reacción, sobre la parte superior de la columna correspondiente (de la que se ha eliminado con anterioridad el tampón de almacenamiento).

Recolectar el material eluido en los tubos de conteo.

Pipetear

1,3 ml del reactivo 5, sobre la parte superior de cada columna, continuando la recolección de todo el material eluido hasta que cese el goteo (volumen final recolectado = 1,6 ml). Se tapan los tubos de conteo y se llevan a un contador gamma.

### CALCULO DE RESULTADOS

La ausencia o presencia del DNA-VHB se determina comparando el número de cuentas netas de la muestra con un valor límite, calculado a partir de los valores de los controles positivos y negativos, según la siguiente fórmula:

$$\text{valor límite} = (0,015 \times \overline{CP}) + \overline{CN}$$

$\overline{CP}$  = media de los controles positivos

$\overline{CN}$  = media de los controles negativos

Las muestras con tasas de contaje iguales o superiores al valor límite se consideran positivas para el DNA-VHB.

Las muestras con tasas de contaje inferiores al valor límite se consideran negativas para el DNA-VHB.

### II.11.- ACTIVIDAD DE LA DNA-POLIMERASA

La actividad de la DNA-polimerasa (DNA-p) se determinó según el método descrito por Marion (156), en el año 1980.

## PROCEDIMIENTO.

Pipetear

0,6 ml de disolución A en tubos de policarbonato de 1 ml de capacidad, y agregar

0,2 ml de cada una de las muestras por duplicado, y de los controles (tres controles negativos y uno positivo), de forma que se mantenga la interfase.

Centrifugar durante 4 horas a 4°C y 6250xg. Retirar dos tercios del sobrenadante y decantar el resto.

Añadir

0,05 ml de disolución II al precipitado y agregar también

0,025 ml de disolución III (preparar justo antes de utilizarla).

Agitar y tapar los tubos y llevarlos a 37°C durante 3 horas. Posteriormente, añadir

0,05 ml del contenido de cada tubo sobre pequeños cuadrados de papel WHAT-MAN grado 3, previamente cortados y numerados.

Añadir sobre cada trozo de papel

0,05 ml de TCA al 5 %.

Lavar los papeles de filtro en solución de TCA 5 % durante 45 minutos. A continuación, lavarlos en solución de pirofosfato sódico 0,1 M, cambiando la solución cada 10 minutos, 3 veces. Por último, dejar en solución de pirofosfato toda la noche y a la mañana siguiente lavarlos con etanol y colocarlos entre dos láminas de papel, para secarlos bien. Introducir en viales de centelleo y añadir

5 ml de líquido de centelleo.

Medir en un contador beta.

### **CALCULO DE RESULTADOS.**

Hallar la media y la desviación standard de los controles negativos y de las muestras y comparar los resultados.

Tomar como controles negativos, sueros que no tengan ningún marcador del VHB positivo.

### **III.- RESULTADOS**

### **III.1.- GESTANTES**

Todas las mujeres incluidas en nuestro trabajo contestaron a una serie de cuestiones acerca de una posible relación con el VHB. Las principales cuestiones fueron las siguientes:

- A) ¿Ha tenido historia antigua de hepatitis?
- B) ¿Convive o ha convivido con enfermo hepático?

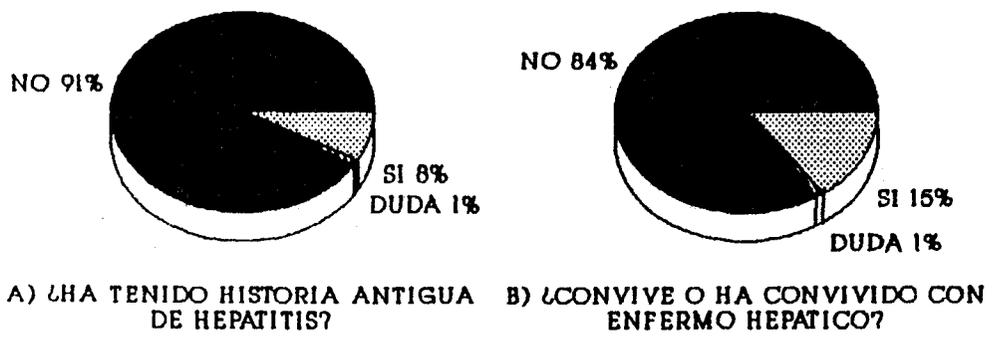
El 91 % de las mujeres manifestaron que no habían tenido hepatitis en el pasado, el 8 % reconocieron haberla tenido, sin especificar, en la mayoría de las ocasiones, el tipo de hepatitis padecida, y el 1 % no sabían con certeza si la habían padecido o no.

Por otro lado, el 84 % de las mujeres manifestaron que no convivían o habían convivido con enfermos hepáticos. El 15 % respondieron de forma afirmativa, pero sin especificar el tipo de enfermedad y el 1 % mostraron desconocimiento al respecto.(Figura 10).

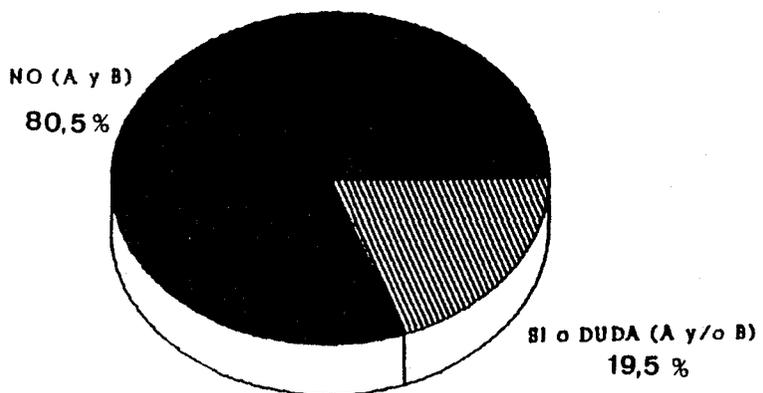
Haciendo una valoración conjunta de las respuestas a las dos preguntas formuladas, nos encontramos que el 80,5 % de las mujeres respondieron de forma negativa a ambas y el 19,5 % restante, de forma afirmativa o expresaron duda a las dos o solamente a una de ellas. (Figura 11).

Por otra parte, en todas las muestras recibidas se determinó el anticuerpo total del core (antiHBc), que fué negativo en 2253 de las muestras analizadas y positivo en las 347 muestras restantes.

Cuando el antiHBc resultó negativo, no se llevó a cabo ninguna otra determinación, exceptuando dos ocasiones, en las que, en la ficha de identificación que acompañaba a la muestra, se indicaba que la gestante había sido vacunada frente al VHB. En estos dos casos se determinó el anticuerpo frente al antígeno de superficie (antiHBs), siendo positivo en las dos gestantes.



**FIGURA 10:** Respuestas de las mujeres gestantes del estudio.



**FIGURA 11:** Valoración conjunta de las respuestas a las preguntas A y B.

De las 347 muestras positivas para el antiHBc, 40 fueron positivas a su vez para el HBsAg, 227 fueron positivas para el antiHBs y 80 fueron negativas para ambos (HBsAg y antiHBs).

De todo ello se deduce que el 1,5 % de la población de mujeres estudiadas eran portadoras del HBsAg. El 3,1 % presentaba el antiHBc positivo, como único marcador serológico, el 8,7 % de la población presentaban una inmunización natural activa con antiHBc y antiHBs positivos y el 0,1 % mostraban inmunización artificial activa con el antiHBs positivo como único marcador serológico.

En total, el 13,4 % de las gestantes presentaban algún marcador serológico del VHB positivo. (Tabla 3).

De las 349 mujeres que tenían algún marcador serológico del VHB positivo, 248 (71 %) habían respondido de forma negativa a las dos preguntas indicadas anteriormente, mientras que 101 (29 %) habían respondido de forma afirmativa o habían expresado duda a las dos preguntas o solamente a una de ellas.

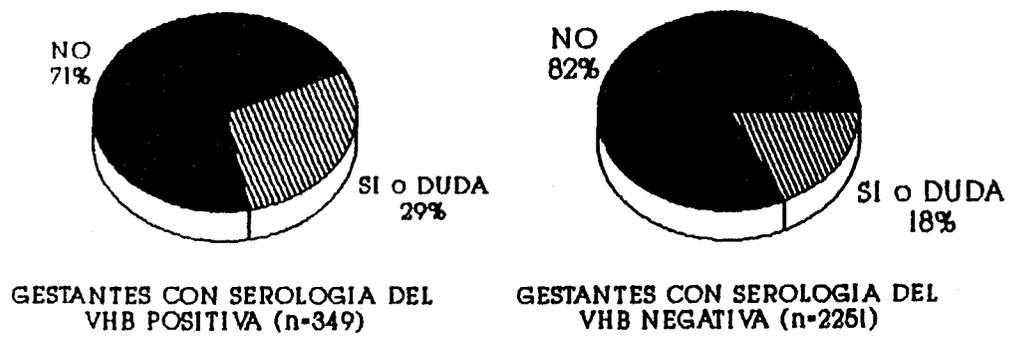
De las 2251 mujeres que no tenían marcadores serológicos del VHB positivos, 1845 (82 %) habían respondido de forma negativa a las dos preguntas y 406 (18 %) lo habían hecho de forma afirmativa o habían expresado duda a las dos o solamente a una de ellas. (Figura 12).

En las muestras de todas las gestantes se determinó la actividad sérica de AST y ALT. El 98 % presentaban cifras de actividad enzimática comprendidas dentro de los valores de referencia para ambas enzimas (AST: 6-45 U/L; ALT: 7-60 U/L), mientras que el 2 % presentaban actividad enzimática elevada. (Figura 13).

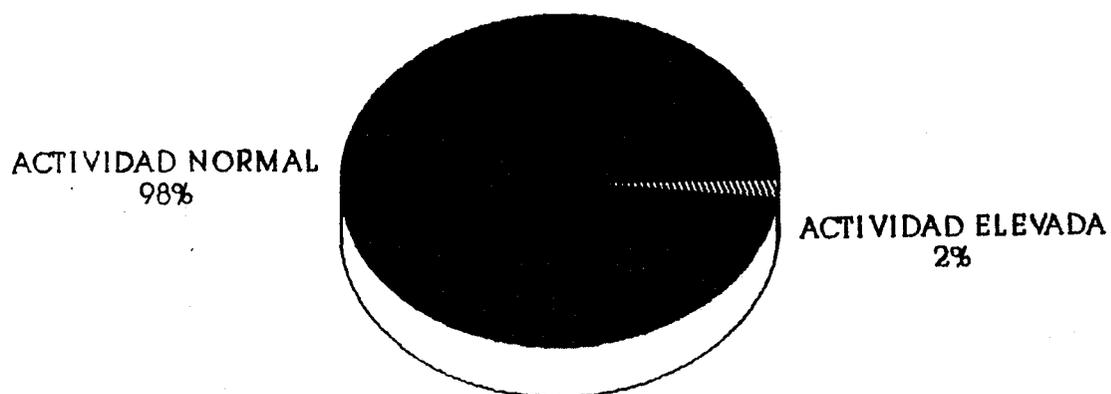
De las 52 gestantes con actividades séricas de AST y ALT elevadas, cuatro de ellas fueron positivas para el antiHBc y antiHBs y tres para el HBsAg y antiHBc. El resto de las gestantes no presentaban ningún marcador serológico del VHB ni del virus de la hepatitis A (antiVHA-IgM).

**TABLA 3**  
**SEROLOGIA DEL VHB EN MUJERES GESTANTES**

MARCADOR SEROLOGICO	Nº GESTANTES	%
HBsAg +	40	1,5
antiHBc +	80	3,1
antiHBs +	2	0,1
antiHBc y antiHBs +	227	8,7
TOTAL	349	13,4



**FIGURA 12:** Relación de la encuesta epidemiológica y el estudio serológico realizado.



**FIGURA 13:** Actividad de AST y ALT en todas las mujeres gestantes del estudio (n=2600).

### **III.2.- GESTANTES HBsAg POSITIVAS.**

De las 2600 mujeres incluidas en el estudio, se han encontrado cuarenta que eran portadoras del HBsAg, lo que indica, que en la población estudiada de nuestro medio, la prevalencia del estado de portador del HBsAg se sitúa en el 1,5 %.

Teniendo en cuenta las respuestas a la encuesta epidemiológica de estas cuarenta gestantes, se vió que 23 (57,5 %) respondieron de forma negativa a las preguntas citadas anteriormente (A y B), mientras que 6 mujeres (15,0 %) respondieron de forma afirmativa a ambas, 3 (7,5 %) respondieron de forma afirmativa a la pregunta A y de forma negativa a la pregunta B y por último, 8 (20,0 %) respondieron de forma negativa a la pregunta A y de forma afirmativa a la pregunta B.

En las gestantes que fueron HBsAg positivas se encontró que el 90 % de ellas eran antiHBe positivo, el 2,5 % era HBeAg positivo y el 7,5 % eran negativas para ambos marcadores. Asimismo, el 2,5 % era antiDelta positivo. (Tabla 4).

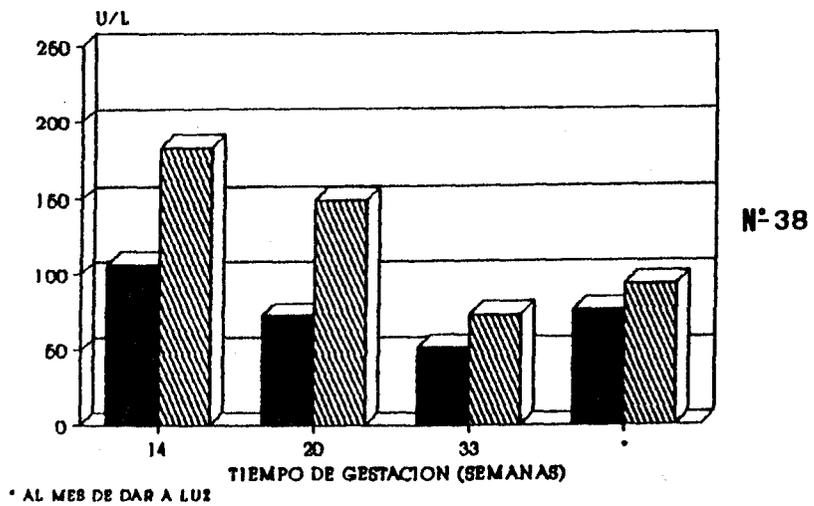
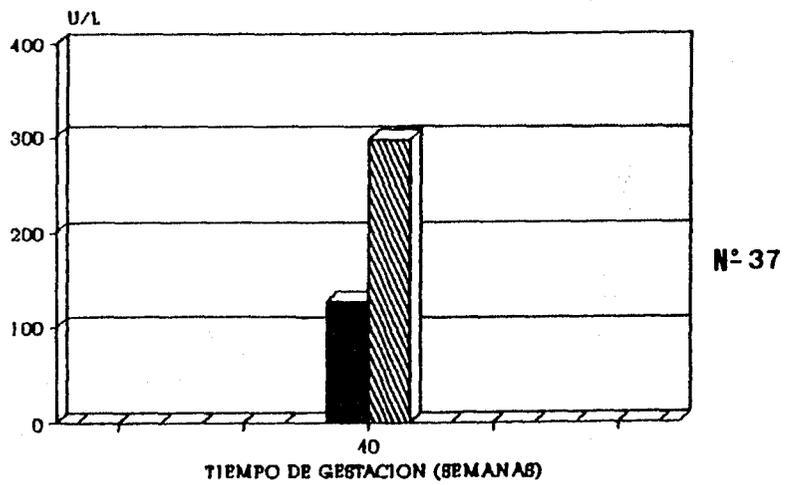
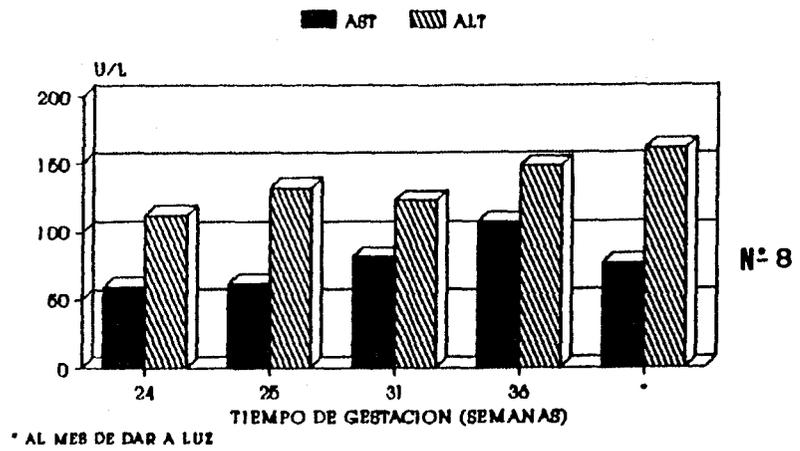
Durante el transcurso del estudio se observó en la gestante nº 4 la desaparición en el suero del antiHBe al mes de dar a luz. En la gestante nº 5, el antiHBe desapareció a las 32 semanas de gestación. En la nº 8 el HBeAg desapareció al mes de dar a luz, y por último, en la gestante nº 31, el HBsAg desapareció mientras que apareció el antiHBe en suero a las 36 semanas de gestación.

Todas las gestantes HBsAg positivas presentaban cifras de actividad de AST y ALT dentro de los valores de referencia citados, excepto en las gestantes nº 8, 37 y 38, en las que estas cifras fueron elevadas de forma persistente en todas las determinaciones llevadas a cabo a lo largo del estudio. (Gráfica 3).

Asímismo, se llevó a cabo la determinación de antígenos del VHB (HBsAg y HBeAg), en células mononucleares de las gestantes HBsAg positivas. El HBsAg fué positivo en todas ellas, excepto en los casos nº 5, 6, 7, 11, 22, 25, 27 y 35. El HBeAg fué negativo en todas, excepto en el caso nº 8. (Tabla 5).

**TABLA 4**  
**SEROLOGIA DEL VHB EN GESTANTES HBsAg POSITIVAS**

Nº	HBsAg	antiHbc	antiHBs	HBeAg	antiHBe	antiDelta
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	+	-
3	+	+	-	-	+	-
4	+	+	-	-	+	-
5	+	+	-	-	+	-
6	+	+	-	-	+	-
7	+	+	-	-	-	-
8	+	+	-	+	-	+
9	+	+	-	-	+	-
10	+	+	-	-	+	-
11	+	+	-	-	+	-
12	+	+	-	-	+	-
13	+	+	-	-	+	-
14	+	+	-	-	+	-
15	+	+	-	-	+	-
16	+	+	-	-	+	-
17	+	+	-	-	+	-
18	+	+	-	-	+	-
19	+	+	-	-	+	-
20	+	+	-	-	+	-
21	+	+	-	-	+	-
22	+	+	-	-	+	-
23	+	+	-	-	+	-
24	+	+	-	-	+	-
25	+	+	-	-	+	-
26	+	+	-	-	+	-
27	+	+	-	-	+	-
28	+	+	-	-	+	-
29	+	+	-	-	+	-
30	+	+	-	-	+	-
31	+	+	-	-	-	-
32	+	+	-	-	+	-
33	+	+	-	-	+	-
34	+	+	-	-	+	-
35	+	+	-	-	+	-
36	+	+	-	-	+	-
37	+	+	-	-	+	-
38	+	+	-	-	+	-
39	+	+	-	-	+	-
40	+	+	-	-	+	-



**GRAFICA 3:** Actividad de AST/ALT en gestantes HBsAg positivas.

**TABLA 5**  
**ANTIGENOS DEL VHB EN CELULAS MONONUCLEARES**

Nº	HBsAg	HBeAg
1	+	-
2	+	-
3	+	-
4	+	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	+	+
9	+	-
10	+	-
11	-	-
12	+	-
13	+	-
14	+	-
15	+	-
16	+	-
17	+	-
18	+	-
19	+	-
20	+	-
21	+	-
22	-	-
23	+	-
24	+	-
25	-	-
26	+	-
27	-	-
28	+	-
29	+	-
30	+	-
31	+	-
32	+	-
33	+	-
34	+	-
35	-	-
36	+	-
37	+	-
38	+	-
39	+	-
40	+	-

En el caso n° 31, el HBsAg desapareció de las células mononucleares a las 36 semanas de gestación y al mismo tiempo se había observado su desaparición en suero.

En el caso n° 8, el HBeAg desapareció de las células mononucleares al mes de dar a luz, momento en el cual se había observado su desaparición en suero.

En todas las muestras de las gestantes HBsAg positivas, se llevó a cabo la determinación del DNA-VHB. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado. Los valores obtenidos se han relacionado con un valor límite ya descrito, de forma que, los resultados expresados en cpm, que se encuentran por encima de este valor, son indicativos de la presencia del DNA del VHB en la muestra de suero analizada.

De las 40 gestantes HBsAg positivas, 21 de ellas presentaban DNA-VHB en suero. Los resultados aparecen reflejados en la Tabla 6 y representados en la Gráfica 4, dónde se observa que los casos n° 8, 17 y 38 presentan cpm bastante elevadas.

Los valores de actividad enzimática de la DNA-p, en las gestantes HBsAg positivas, se encontraron dentro del mismo rango que los obtenidos para los controles negativos empleados en la determinación de la misma.

### **III.3.- SANGRE DEL CORDON.**

En el momento del parto se obtuvo sangre del cordón de los hijos de madres HBsAg positivas. Sólo se pudo realizar la extracción en 32 casos, ya que el resto de las madres dieron a luz fuera de nuestro control, por lo que no se pudo obtener la muestra correspondiente.

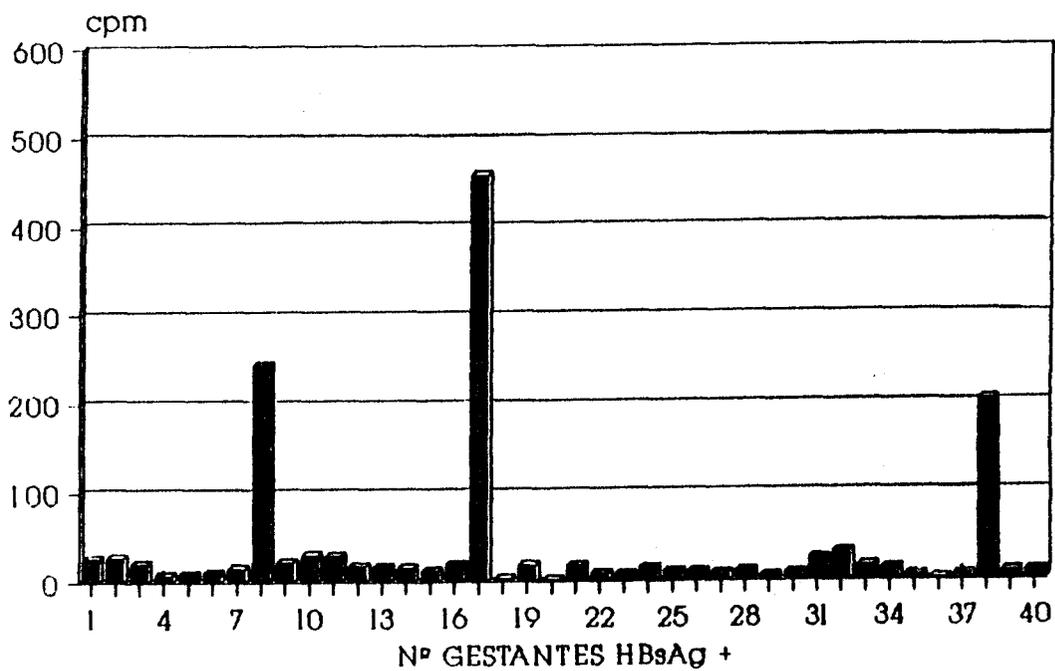
En todas las muestras se llevó a cabo la determinación del HBsAg, antiHBc(total), antiHBc(IgM) y antiHBs. Si el HBsAg resultaba positivo, se determinaba el HBeAg, antiHBe y antiDelta.

En las 32 muestras analizadas, el antiHBc(total) fué positivo y el antiHBc(IgM) negativo, al igual que el antiHBs.

**TABLA 6**  
**DNA - VHB EN GESTANTES HBsAg POSITIVAS**

Nº	cpm
1	26,5
2	27,5
3	20,8
4	7,6
5	9,1
6	11,0
7	15,7
8	243,3
9	22,5
10	30,5
11	29,6
12	17,9
13	17,2
14	15,5
15	12,7
16	20,0
17	457,5
18	3,3
19	18,5
20	2,8
21	18,3
22	8,5
23	8,2
24	15,1
25	10,9
26	10,5
27	9,0
28	11,8
29	6,3
30	9,2
31	26,3
32	33,1
33	16,5
34	13,4
35	6,3
36	2,5
37	7,1
38	202,5
39	9,8
40	10,3

(Valor límite = 12,7)



**GRAFICA 4: DNA - VHB en gestantes HBsAg positivas.**

El HBsAg fué negativo también en todas ellas, menos en los casos n° 3, 10, 14, 36 y 40. En estos últimos, el HBeAg y antiDelta fueron a su vez negativos y el antiHBe positivo.

Siempre que el HBsAg fué positivo, se repitió la determinación en el suero del niño al mes de edad, encontrándonos que había desaparecido en todos ellos, menos en el caso n° 10, en el que se repitió la determinación a los dos meses de edad, siendo entonces negativo. (Tabla 7).

#### **III.4.- FAMILIARES DE GESTANTES HBsAg POSITIVAS**

Se han estudiado en total 188 familiares de 36 gestantes HBsAg positivas, distribuidos de la siguiente forma: 36 cónyuges, 15 hijos, 19 hijas, 14 padres, 26 madres, 39 hermanos y 39 hermanas, y se han encontrado los siguientes datos para el VHB (Tabla 8):

- HBsAg positivo: 1 cónyuge, 1 hijo, 3 padres, 2 madres, 4 hermanos y 12 hermanas, arrojando un total de 23 familiares HBsAg positivos (12,2 %).
- antiHBe positivo: 5 cónyuges, 2 hijas, 2 padres, 5 madres, 6 hermanos y 1 hermana, arrojando un total de 21 familiares antiHBe positivos (11,2 %).
- antiHBe y antiHBs positivos: 9 cónyuges, 2 hijos, 1 hija, 5 padres, 16 madres, 10 hermanos y 16 hermanas, arrojando un total, para los dos marcadores, de 59 casos positivos (31,4 %).

Se ha visto que en total, 103 de los familiares (54,8 %), tenían algún marcador serológico del VHB positivo.

En los 23 familiares HBsAg positivos se determinó el HBeAg, antiHBe y antiDelta, obteniéndose los siguientes resultados (Tabla 9):

- HBeAg positivo: 1 hijo, 2 hermanos y 1 hermana, arrojando un total de 4 familiares HBeAg positivos.

**TABLA 7**  
**SEROLOGIA DEL VHB EN SANGRE DEL CORDON**

Nº	HBsAg	antiHbc (total)	antiHbc (IgM)	antiHBs	HBeAg	antiHBe	antiDelta
2	-	+	-	-			
3	+	+	-	-	-	+	-
4	-	+	-	-			
5	-	+	-	-			
6	-	+	-	-			
8	-	+	-	-	-	-	+
10	+	+	-	-	-	+	-
11	-	+	-	-			
14	+	+	-	-	-	+	-
15	-	+	-	-			
16	-	+	-	-			
17	-	+	-	-			
18	-	+	-	-			
19	-	+	-	-			
20	-	+	-	-			
21	-	+	-	-			
22	-	+	-	-			
23	-	+	-	-			
24	-	+	-	-			
25	-	+	-	-			
26	-	+	-	-			
27	-	+	-	-			
28	-	+	-	-			
29	-	+	-	-			
31	-	+	-	-			
32	-	+	-	-			
33	-	+	-	-			
34	-	+	-	-			
35	-	+	-	-			
36	+	+	-	-	-	+	-
39	-	+	-	-			
40	+	+	-	-	-	+	-

**TABLA 8**  
**MARCADORES SEROLOGICOS DEL VHB EN FAMILIARES**

GRUPO FAMILIAR	HBsAg	antiHBc	antiHBc y antiHBs	ALGUN MARCADOR	Nº CASOS
CONYUGES	1	5	9	15	36
HIJOS	1	0	2	3	15
HIJAS	0	2	1	3	19
PADRES	3	2	5	10	14
MADRES	2	5	16	23	26
HERMANOS	4	6	10	20	39
HERMANAS	12	1	16	29	39
TOTAL	23	21	59	103	188

**TABLA 9**  
**HBeAg/antiHBe/antiDelta EN FAMILIARES**

	HBeAg	antiHBe	antiDelta
CONYUGES	0	1	0
HIJOS	1	0	0
PADRES	0	5	0
HERMANOS	3	12	0
TOTAL	4	18	0

- antiHBe positivo: 1 cónyuge, 3 padres, 2 madres, 2 hermanos y 10 hermanas, arrojando un total de 18 familiares antiHBe positivos.
- antiDelta positivo: No se encontró ningún familiar con antiDelta positivo en suero.

Asímismo, se determinó la actividad sérica de la AST y ALT, en todos ellos, y se vió que era normal en 175 casos, mientras que era elevada en: 2 cónyuges, 2 hijos, 1 hija, 1 madre, 5 hermanos y 2 hermanas, arrojando un total de 13 familiares con actividad sérica de AST y ALT elevadas.

De estos 13 familiares, 2 eran HBsAg y antiHBe positivos, 4 eran HBsAg y HBeAg positivos, 2 eran antiHBc positivos, 2 eran antiHBc y antiHBs positivos y el resto no presentaban ningún marcador serológico del VHB.

Por otro lado, se ha realizado un estudio comparativo de la prevalencia de los marcadores serológicos del VHB en los diferentes grupos familiares.

En primer lugar, se ha comparado el grupo de cónyuges con cada uno de los grupos restantes (hijos, padres y hermanos).

Así, se ha visto que entre cónyuges e hijos no existen diferencias significativas en la prevalencia de marcadores serológicos del VHB (Tabla 10).

Entre cónyuges y padres no existen diferencias significativas en cuanto a la prevalencia del HBsAg, pero sí las hay en lo que se refiere a la prevalencia de anticuerpos frente al VHB (antiHBc y/o antiHBs). (Tabla 11).

Entre cónyuges y hermanos existen diferencias significativas en cuanto a la prevalencia del HBsAg y no existen diferencias significativas en la prevalencia de anticuerpos frente al VHB. (Tabla 12).

También se ha comparado el grupo de los cónyuges con el resto de los familiares en conjunto (hijos, padres y hermanos) y se ha visto que existen diferencias significativas, en la prevalencia del HBsAg, no así en la prevalencia de anticuerpos frente al VHB. (Tabla 13).

**TABLA 10**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
CONYUGES	36	1(2,8)	14(38,9)	15(41,7)
HIJOS	34	1(2,9)	5(14,7)	6(17,6)
p		NS	NS	NS

**TABLA 11**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
CONYUGES	36	1(2,8)	14(38,9)	15(41,7)
PADRES	40	5(12,5)	28(70,0)	33(82,5)
p		NS	< 0,05	< 0,001

**TABLA 12**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
CONYUGES	36	1(2,8)	14(38,9)	15(41,7)
HERMANOS	78	16(20,5)	33(42,3)	49(62,8)
p		< 0,05	NS	NS

**TABLA 13**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
CONYUGES	36	1(2,8)	14(38,9)	15(41,7)
HIJOS PADRES Y HERMANOS	152	22(14,5)	66(43,4)	88(57,9)
p		< 0,05	NS	NS

Por otro lado, se ha visto que entre el grupo de hijos y el de hermanos, existen diferencias significativas en la prevalencia del HBsAg, así como en la prevalencia de anticuerpos. (Tabla 14).

Asímismo, se han comparado los familiares que conviven en el momento actual con la gestante HBsAg positiva (cónyuges e hijos), con los familiares que convivían con ella anteriormente (padres y hermanos), encontrando que existen diferencias significativas, tanto en la prevalencia del HBsAg, como en la prevalencia de anticuerpos frente al VHB. (Tabla 15).

En relación con la edad, se ha visto que la prevalencia de marcadores del VHB ha sido del 25,0 % en el grupo más joven (0-9 años), y del 81,1 % en el grupo de más edad ( $\geq 50$  años). (Tabla 16).

En relación con el sexo, se ha comprobado que no existen diferencias significativas en la prevalencia de marcadores del VHB entre los hijos e hijas (Tabla 17), padres y madres (Tabla 18), mientras que sí existen diferencias significativas en la prevalencia del HBsAg entre hermanos y hermanas (Tabla 19).

En términos globales, la prevalencia de marcadores del VHB ha sido, en nuestro estudio, superior en las hembras que en los varones. (Tabla 20).

Por otra parte, se ha comprobado que no existen diferencias significativas en la prevalencia de marcadores serológicos del VHB entre los familiares de gestantes HBeAg positivas, familiares de gestantes antiHBe positivas y familiares de gestantes negativas para ambos marcadores. (Tabla 21).

Asímismo, se ha visto que tampoco existen diferencias significativas en la prevalencia de marcadores del VHB entre los familiares de mujeres con DNA-VHB en el suero y familiares de mujeres que no presentan este marcador. (Tabla 22).

Por último, tampoco existen diferencias significativas en cuanto a la prevalencia del VHB en los familiares de las mujeres portadoras, atendiendo al número de personas integrantes de cada familia. (Tabla 23).

**TABLA 14**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
HIJOS	34	1(2,9)	5(14,7)	6(17,6)
HERMANOS	78	16(20,5)	33(42,3)	49(62,8)
p		< 0,05	< 0,01	< 0,001

**TABLA 15**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
CONYUGES E HIJOS	70	2(2,9)	19(27,1)	21(30,0)
PADRES Y HERMANOS	118	21(17,8)	61(51,7)	82(69,5)
p		< 0,01	< 0,01	< 0,001

**TABLA 16**

EDAD (AÑOS)	Nº FAMILIARES	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
0-9	28	2(7,1)	5(17,9)	7(25,0)
10-19	23	3(13,1)	5(21,7)	8(34,8)
20-29	54	8(14,8)	24(44,4)	32(59,2)
30-39	37	5(13,5)	16(43,2)	21(56,7)
40-49	9	1(11,1)	4(44,5)	5(55,6)
≥ 50	37	4(10,8)	26(70,3)	30(81,1)
p		NS	< 0,01	< 0,001

**TABLA 17**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
HIJOS	15	1(6,7)	2(13,3)	3(20,0)
HIJAS	19	0	3(15,8)	3(15,8)
p		NS	NS	NS

**TABLA 18**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
PADRES	14	3(21,4)	7(50,0)	10(71,4)
MADRES	26	2(7,7)	21(80,8)	23(88,5)
p		NS	NS	NS

**TABLA 19**

GRUPO	NUMERO CASOS	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
HERMANOS	39	4(10,2)	16(41,0)	20(51,2)
HERMANAS	39	12(30,8)	17(43,6)	29(74,4)
p		< 0,05	NS	< 0,05

**TABLA 20**

	Nº FAMILIARES	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
VARONES	104	9(8,6)	39(37,5)	48(46,1)
HEMBRAS	84	14(16,7)	41(48,8)	55(65,5)
p		NS	NS	< 0,05

**TABLA 21**

GRUPO	NUMERO CASOS	ALGUN MARCADOR
FAMILIARES DE GESTANTES HBeAg +	3	1(33,3)
FAMILIARES DE GESTANTES antiHBe +	180	98(54,4)
FAMILIARES DE GESTANTES HBeAg y antiHBe -	5	4(80,0)
p		NS

**TABLA 22**

	NUMERO CASOS	ALGUN MARCADOR
FAMILIARES DE GESTANTES DNA-VHB +	92	51(55,4)
FAMILIARES DE GESTANTES DNA-VHB -	96	52(54,2)
P		NS

**TABLA 23**

TAMAÑO FAMILIAR	NUMERO FAMILIARES	HBsAg	antiHBc y/o antiHBs	ALGUN MARCADOR
2-4 PERSONAS	38	4(10,5)	15(39,5)	19(50,0)
5-8 PERSONAS	119	17(14,3)	46(38,6)	63(52,9)
≥ 9 personas	31	2(6,4)	19(61,3)	21(67,7)
P		NS	NS	NS

### **III.5.- VIRUS DE LA HEPATITIS C (VHC)**

Con el fin de estudiar la prevalencia de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C (antiVHC) en las gestantes incluidas en nuestro estudio, se ha llevado a cabo la determinación de este anticuerpo en un total de 265 mujeres distribuidas en cuatro grupos:

- GRUPO I: 45 gestantes con actividades de AST y ALT elevadas y ningún marcador serológico del VHB, ni del VHA.
- GRUPO II: 80 gestantes con actividades de AST y ALT dentro de los límites de referencia y positivas para el anticuerpo del core del VHB.
- GRUPO III: 40 gestantes HBsAg positivas, identificadas a lo largo del estudio, cuyas características serológicas y bioquímicas se han comentado anteriormente.
- GRUPO IV: 100 gestantes con actividades de AST y ALT dentro de los límites de referencia y sin ningún marcador serológico del VHB positivo.

Se han encontrado en total, 8 mujeres con el antiVHC positivo, lo que equivale a una prevalencia de este anticuerpo del 3,0 %.

De las 8 mujeres, dos pertenecían al Grupo I, tres al Grupo II, dos al Grupo III y una al Grupo IV. (Tabla 24).

**TABLA 24**

GRUPOS	antiVHC	NUMERO CASOS
I	2(4,4)	45
II	3(3,7)	80
III	2(5,0)	40
IV	1(1,0)	100
p	NS	

## **I.- DISCUSSION**

La prevalencia de marcadores del VHB en el suero de los familiares de las mujeres gestantes, portadoras del HBsAg, ha sido en nuestro estudio, del 54,8 %.

Los estudios realizados por González (157) y Genescá (158) en familiares de portadores, varones y hembras indistintamente, del VHB, indican unos porcentajes del 33 % y 33,8 %, respectivamente; como se aprecia, estos datos son inferiores a los encontrados en nuestro trabajo.

Esta diferencia se puede explicar porque el grupo estudiado por nosotros es más homogéneo, puesto que se refiere únicamente a familiares de un grupo de gestantes portadoras del VHB.

Asimismo, creemos que puede jugar algún papel en esta discordancia, la zona geográfica concreta y el sitio puntual en el que nuestro trabajo se ha llevado a cabo.

Por otra parte, estudios llevados a cabo por Acero (159), y Vargas (160), investigando marcadores del VHB en una población heterogénea y supuestamente sana, citan porcentajes del 0,6 % y 1,8 %, respectivamente. Dichos datos son asimismo inferiores a los nuestros. De todo ello se puede deducir la importancia que en general tiene la transmisión del VHB dentro del núcleo familiar.

El mecanismo de transmisión del VHB en la familia no está definitivamente aclarado, aunque se barajan diferentes hipótesis, como son la transmisión horizontal en sus diferentes aspectos y la transmisión vertical, como se verá más adelante. Siguiendo en esta línea, aparecen en la bibliografía trabajos que indican que la vía sexual juega un papel importante en la transmisión del VHB, como indican Wright (161), Alter (162), Heun (163) y Tassopoulos (164). Así, encontramos que el 41,7 % de los cónyuges presentan algún marcador del VHB positivo en el suero. Dicho porcentaje es similar al encontrado en los trabajos de Genescá (158) y Ramalho (165) que citan valores del 45 % y 45,5 %, respectivamente. Se puede considerar que si la vía sexual tuviera un papel predominante sobre otros tipos de transmisión del VHB, cabría esperar una mayor prevalencia de marcadores en los cónyuges, en comparación con el resto de los familiares (padres, hermanos e hijos). Sin embargo, nuestros datos indican que la prevalencia de marcadores del virus en los cónyuges es menor que en los padres (Tabla 11), hermanos (Tabla 12) y mayor que en los hijos (Tabla 10), aunque en estos dos últimos casos las

diferencias no son significativas.

De estos datos se deduce que la transmisión sexual del VHB parece que no juega un papel fundamental en la propagación del virus dentro de la familia y puedan tener más importancia otras vías de transmisión.

Destaca en nuestro trabajo la baja prevalencia del HBsAg en el grupo de cónyuges estudiado, de forma que sólo el 2,8 % era HBsAg positivo, mientras que Genescá (158) no presenta ningún caso positivo para el mismo marcador. Este autor sugiere que el mecanismo de transmisión se lleva a cabo a través de la sangre de la mujer portadora del virus (menstruación, erosiones vaginales, etc.), con la aparición frecuente en los cónyuges de antiHBc y/o antiHBs. Por lo tanto, pensamos que el hecho de que en pocas ocasiones los cónyuges desarrollen el estado de portador crónico del VHB puede estar relacionado con la observación formulada por Stevens (54), Beasley (82) y Sasaki (83) de que la posibilidad de que un sujeto cualquiera se convierta en portador crónico del VHB, es mayor cuanto menor es la edad a la que se produce la infección, habida cuenta de que es posible que el VHB infecte al grupo de cónyuges en la edad adulta y suponiendo la ausencia de marcadores en los mismos con anterioridad.

Por otra parte, se ha visto que el 17,6 % de los hijos tenían algún marcador del VHB positivo. Esta cifra es similar a la citada por otros autores como Szmunn (166) y Bernier (167) para zonas de baja incidencia en la infección por el VHB, e inferior al 31 %, 42,3 % y 66,7 % indicados para nuestra zona geográfica (157,158,165).

Con respecto a los hermanos de las mujeres portadoras, se observa que el 62,8 % tienen algún marcador del VHB positivo. Se han citado en la bibliografía porcentajes similares (157,165,167). A la vista de estos datos se puede deducir que la transmisión vertical del VHB no se considera un mecanismo importante en la difusión de la infección dentro de la familia, mientras que sí parece serlo la transmisión horizontal del virus. Por lo tanto, consideramos que la infección por el VHB se transmite fundamentalmente por una vía horizontal, mientras que, aunque la transmisión vertical no es trascendente, sí que es importante el posterior contacto y convivencia del niño con la madre portadora. Bernier (167) y González (157) concluyen que la transmisión horizontal tiene una gran repercusión en la difusión del VHB en la familia, mientras que por otro lado, existen autores que indican que el mecanismo de transmisión vertical es el principal

responsable del contagio de los hijos de mujeres portadoras y calculan aproximadamente que entre un 15 % y un 25 % de los portadores de nuestro medio se han infectado verticalmente (158).

Ante estos hechos y teniendo en cuenta los datos de la Tabla 14, consideramos que apenas existe en nuestro estudio transmisión vertical, mientras que sí se da la transmisión horizontal. Ello viene apoyado en los porcentajes encontrados para el HBsAg en los hijos, un 2,9 %, que hablan en contra de una transmisión vertical, mientras que los encontrados para los hermanos de las mujeres portadoras son de un 20,5 %, dato que habla en favor de un mecanismo de transmisión horizontal en la familia. Todo lo citado se ve respaldado por la mejora evidente de las condiciones higienico-sociales de una generación a otra.

Por otra parte, se ha visto que el grupo de padres de las mujeres HBsAg positivas es el de mayor prevalencia de marcadores del VHB (82,5 %), seguido por el grupo de los hermanos (62,8 %), cónyuges (41,7 %) e hijos (17,6 %). Coincidiendo con nuestros datos, Szmunn (166) y Bernier (167), encuentran una prevalencia de marcadores del VHB en los padres y hermanos superior a la de los cónyuges, y en los hijos inferior a la de todos ellos, mientras que Bruguera (168) encuentra que los marcadores del VHB son más frecuentes en los hermanos e hijos que en los padres y que ninguno de estos grupos supera la prevalencia encontrada en los cónyuges.

Pensamos que la mayor prevalencia de marcadores del VHB en los padres, se puede relacionar con el hecho de que este grupo es el de más edad y por tanto, el que supuestamente ha estado más tiempo expuesto al VHB. Así, en la Tabla 16, se observa que la prevalencia de marcadores del VHB es del 25,0 % en el grupo más joven (0-9 años), y del 81,1 % en el grupo de más edad ( $\geq 50$  años). Asimismo, en la citada tabla, también se puede ver que la prevalencia de anticuerpos frente al VHB aumenta con la edad, mientras que la prevalencia del HBsAg sólo aumenta hasta la tercera década y comienza a disminuir a partir de los 30 años.

Este hecho podría explicarse en parte, por la tendencia natural a eliminar el virus que muestran los portadores del VHB.

La prevalencia de marcadores del VHB ha sido en nuestro estudio, en términos

globales, superior en las mujeres que en los hombres (Tabla 20). Así, la prevalencia de anticuerpos frente al VHB, siempre es mayor en las hermanas, hijas y madres que en los hermanos, hijos y padres (Tablas 17, 18 y 19).

Sin embargo, aunque la prevalencia del HBsAg también es mayor en las hermanas que en los hermanos, no sucede así en los otros grupos, en los que encontramos una prevalencia superior en los hijos y padres que en las hijas y madres, aunque en estos dos últimos casos, las diferencias no son significativas.

Nuestros datos no coinciden con los citados en la bibliografía (157), donde se indica una prevalencia del HBsAg superior en los familiares del sexo masculino, atribuyéndolo a que las mujeres eliminan con más facilidad el VHB que los hombres debido a una mayor capacidad de respuesta inmune, según la teoría expuesta por London (169).

En el presente estudio no se ha podido comprobar este hecho, pese a la amplitud del mismo.

La presencia del HBeAg, antiHBe o la ausencia de los dos marcadores, en el suero de las mujeres HBsAg positivas de nuestro trabajo, parece que no ha influido de forma significativa sobre la presencia de marcadores del VHB en sus familiares, según se observa en la Tabla 21, y coincidiendo con los trabajos realizados en este sentido (157,158,165), en los que tampoco se encuentran datos significativos a este respecto.

Este fenómeno podría ser debido a que algunas mujeres fueron HBeAg positivas cuando infectaron a sus familiares o que su replicación viral fué importante en aquel momento. Para definir la infectividad de la mujer, con independencia del sistema E, sería necesaria la presencia en sangre circulante de DNA-VHB. No obstante, de nuestros datos se deduce que la presencia del DNA-VHB en el suero de las mujeres portadoras crónicas no influye de forma significativa en la aparición de marcadores del VHB en sus familiares (Tabla 22). Por todo lo cual consideramos que deben existir factores que actúen de una forma determinante en la transmisión del VHB en la familia, como la higiene personal, habitabilidad y limpieza de la vivienda, costumbres y hábitos familiares, nivel cultural y económico, etc. Todo lo citado jugaría un papel de gran importancia, dentro de la familia, a la hora de valorar la prevalencia en su seno de marcadores del VHB.

Coincidiendo con algunos resultados publicados en el año 1988 (157), de los datos de nuestro estudio se puede comprobar que no existen diferencias significativas en cuanto a la prevalencia del VHB en los familiares de las mujeres portadoras, atendiendo al número de personas integrantes de cada familia (Tabla 23). Aunque existe algún autor que discrepa en este punto. Así Bernier (167) encuentra diferencias significativas en lo que se refiere a la prevalencia de marcadores del VHB en general, según fuese la familia de 2 a 4 miembros, de 5 a 8 y de 9 o más miembros.

También hemos observado algunos datos que nos indican que hay familias con un gran número de miembros de las mismas con marcadores para el VHB, llegándose en algún momento al 100 % de los familiares que conviven en el hogar. Esto puede sugerir, además de los hábitos higiénicos-sociales citados, la posible existencia de ciertos factores genéticos determinantes de la infección por el VHB. En este sentido hablan también otros trabajos (157,168,170).

Con el fin de llevar a cabo el estudio generacional, disponemos de un total de 36 núcleos familiares, y en cada uno de ellos se estudian tres generaciones, abuelos, padres e hijos.

El criterio de selección de las familias se ha realizado incluyendo únicamente a las mujeres portadoras de nuestro estudio, que se corresponden con las mujeres portadoras de la segunda generación, las cuales no pertenecían a ningún grupo de riesgo.

Los datos obtenidos a escala generacional se refieren únicamente a aquellas familias con alta probabilidad de infección por el VHB, y en ningún caso a los grupos familiares del resto de las mujeres incluidas en el estudio.

En los niños nacidos a lo largo de nuestro trabajo, no ha habido indicios de infección por el VHB, mientras que en los 34 hijos nacidos con anterioridad al inicio del estudio (3ª generación), se ha detectado un portador del HBsAg.

Se ha hecho, asimismo, dentro de cada generación, una clasificación de la siguiente forma: sujetos sin marcadores del VHB, sujetos con marcadores del VHB y sujetos portadores del HBsAg. De este modo quedan reflejados los sujetos que no han tenido contacto con el VHB (sin marcadores), los que han tenido contacto con el VHB (con

marcadores) y los portadores del antígeno de superficie del VHB.

En la Tabla 25 se expone el resumen de los datos hallados para la primera, segunda y tercera generación, con el fin de observar el estado serológico de las tres generaciones. Así, de los 40 miembros de la primera, 5 son portadores del HBsAg (12,5 %), 28 tienen marcadores del VHB (70 %) y 7 no tienen ningún marcador (17,5 %). De los 114 sujetos pertenecientes a la segunda generación, 52 son portadores del HBsAg (45,6 %), 33 tienen marcadores del VHB (28,9 %) y 29 no tienen ningún marcador (25,4 %). De los 34 sujetos pertenecientes a la tercera generación, 1 es portador del HBsAg (2,9 %), 5 tienen algún marcador del VHB (14,7 %) y 28 no tienen ningún marcador (82,3 %).

Si observamos estos datos, en lo que respecta a portadores del HBsAg en la 1ª, 2ª y 3ª generación, las variaciones son del 12,5 %, 45,6 % y 2,9 %, respectivamente. Estos cambios ponen de manifiesto una sensible reducción entre la 2ª y 3ª generación, aunque pensamos que ésta no es tan acusada porque el concepto de sujeto portador en la 2ª generación ha sido el criterio determinante en la realización del presente estudio.

Al comparar la 1ª y 3ª generación y observar los datos correspondientes, la disminución que se observa puede ser debida a un descenso real del número de portadores en el colectivo estudiado, entre otros factores.

Con el mismo criterio se puede contemplar el porcentaje de sujetos con marcadores del VHB en las tres generaciones motivo de esta discusión. Así, los cambios observados entre las generaciones son del 70 %, 28,9 % y 14,7 % para la 1ª, 2ª y 3ª generación, respectivamente. El porcentaje de sujetos sin marcadores del VHB ha pasado del 17,5 % al 82,3 % de la 1ª a la 3ª generación.

Estas variaciones reflejan, en su conjunto, que el contacto con el VHB en cada generación se va reduciendo, de forma espontánea, en un porcentaje cercano al 50 %, de una generación a otra. Todos estos hechos se justifican, como ya se ha citado reiteradamente, por la mejora de los hábitos higiénicos, sociales, culturales, etc., así como a la disminución en el número de portadores encontrada y se podrían atribuir, en parte, a la diferencia de edad entre las tres generaciones, este es un dato que podrá ser comprobado cuando los niños recién nacidos, vacunados en los dos últimos años, alcancen la edad adecuada para realizar un estudio similar al que nosotros hemos llevado

**TABLA 25**  
**MARCADORES DEL VHB EN LAS TRES GENERACIONES**

GENERACION	Nº	HBsAg	CON MARCADORES	SIN MARCADORES
1ª	40	5(12,5)	28(70,0)	7(17,5)
2ª	114	52(45,6)	33(28,9)	29(25,4)
3ª	34	1(2,9)	5(14,7)	28(82,3)

a cabo. Esperamos que entonces, la prevalencia del VHB haya disminuido, en relación a la que existe en la actualidad.

Por otra parte, todas las mujeres de nuestro estudio contestaron a una serie de cuestiones, acerca de una posible relación con el VHB, y que nosotros hemos comparado con los resultados serológicos obtenidos.

Las mujeres con serología positiva para el VHB, habían contestado negativamente a las dos preguntas el 71 %, como se citó con anterioridad. Los marcadores encontrados en este grupo de mujeres, expresado en porcentajes, fueron los siguientes: HBsAg y antiHBc: 6,6 %, antiHBc: 15,8 %, antiHBc y antiHBs: 47,8 % y antiHBs: 0,6 %, mientras que las que contestaron afirmativamente o expresaron dudas con respecto a las cuestiones planteadas presentaban unos porcentajes de los marcadores serológicos en el suero de: HBsAg y antiHBc: 4,9 %, antiHBc: 7,1 %, antiHBc y antiHBs: 17,2 %.

En el grupo de mujeres con serología negativa la respuesta fue negativa asimismo en el 82 % de los casos, mientras que las contestaciones afirmativas o dudosas alcanzaban el 18 %.

Todo lo anterior nos lleva a plantear que ante un número elevado de mujeres que decían desconocer cualquier antecedente en relación con el VHB y sus formas clínicas, y que por tanto, según Gunby (171), Wetzel (172) y Baker (173), habrían de ser excluidas como posibles transmisoras-portadoras del VHB, se encuentra que existen marcadores en el suero, lo cual indica que han estado o están en contacto con el VHB y en consecuencia, se plantea la necesidad de realizar estudios serológicos seriados en todas las mujeres gestantes, en coincidencia con los trabajos de Snyderman (74) y Foschini (112).

Por otra parte, en el estudio serológico practicado en las mujeres que componen nuestro grupo de trabajo, se ha encontrado que el 1,5 % eran portadoras del HBsAg y antiHBc total. Este valor, con independencia de que se puede comparar al obtenido para la población general del área mediterránea, en la que se encuentra incluida España, es similar al encontrado por otros autores como González (174) en Palma de Mallorca, Genescá (51) en Barcelona y Castillo (175) en Granada, con porcentajes del 1 %, 1,2 % y 1,6 %, respectivamente.

Se deduce pues, que el 98,5 % de las gestantes de nuestro estudio, no presentaban el HBsAg positivo, no obstante y teniendo en cuenta que en nuestro trabajo se ha realizado la determinación del antiHBc total como método de "screening", se ha podido observar que el 3,1 % de las mujeres presentaban antiHBc positivo como único marcador serológico del VHB, mientras que en el 8,7 % del total se encontraron el antiHBc y antiHBs positivos en el suero. Finalmente, el 0,1 % mostraron el antiHBs positivo como único marcador.

De lo anterior se deduce también, que no basta con hacer la encuesta epidemiológica, siempre expuesta a una serie de dificultades derivadas del nivel cultural, social, etc, sino que se debe hacer un estudio serológico rutinario, en relación con el VHB, en todas las mujeres en periodo de gestación.

Nosotros pensamos que se debe iniciar dicho estudio con la realización del antiHBc, puesto que, siendo un marcador serológico discutido actualmente, en lo que se refiere a su interpretación, es cierto que todas las personas que han estado alguna vez en su vida o están en la actualidad en contacto con el VHB, lo pueden presentar positivo. Como la positividad de dicho anticuerpo, indica en la mayoría de los casos, contacto con el VHB, se deberá continuar el estudio de la mujer, realizando en el suero de la misma, la determinación del HBsAg y antiHBs.

En el caso de que el HBsAg sea positivo se debe seguir el estudio con la determinación del HBeAg, antiHBe y antiDelta.

McMahon (176), en el año 1987, utiliza asimismo, la determinación del antiHBc como "screening" en un programa destinado a frenar la propagación de la infección por el VHB en la población de Alaska. Igualmente, Lok (177), en el año 1988, indica que una forma de identificar a las personas susceptibles de vacunación y sujetos inmunizados, así como portadores del VHB, podría ser la determinación inicial del antiHBc; este autor ha encontrado en una zona de alta prevalencia del HBsAg, como es Hong-Kong, la presencia del antiHBc como único marcador serológico del VHB, en el 11,9 % de la población, mientras que en nuestro estudio ha sido del 3,1 %, valor muy próximo al encontrado por otros autores como Hadler (178) y Tedders (179), que lo sitúan entre el 2 y el 3 %.

Asimismo, en nuestro trabajo hemos encontrado positivos el antiHBc y antiHBs en el 8,7 % de las gestantes estudiadas, lo que indica que estas mujeres han estado en contacto con el VHB y quizás se encuentren inmunizadas frente al mismo.

Pensamos, a diferencia de Rull (180) y Domínguez (181) que el exámen serológico rutinario no se debería realizar únicamente en grupos de riesgo como drogadictas, prostitutas, etc, sino que poco a poco, tendría que abarcar a toda la población, aunque en el caso de la vacuna frente al VHB se tengan que realizar todavía estudios previos que analicen los costes y el grado de inmunización, entre otros factores. No obstante, las mujeres gestantes se deben incluir dentro de un programa que contemple la determinación de marcadores serológicos del VHB en todas ellas, y proceder, en su caso, a la profilaxis del recién nacido y de las personas que convivan en el hogar. En este punto, coincidimos con los estudios de Descos (182), Martino (73), y Foschini (112), hechos en Italia y Francia, dado que estos dos países se encuentran en la zona geográfica mediterránea, igual que España, en relación con la distribución geográfica del VHB ya indicada anteriormente.

En naciones con alto nivel social y económico, como Estados Unidos, se recomienda la determinación de marcadores del VHB a todas las embarazadas según citan diferentes autores como Summers (183), Kumar (184), McQuillan (185) y Stevens (186).

En nuestro hospital se vienen realizando rutinariamente estas determinaciones desde Enero de 1988 y han sido incluidas dentro de los análisis asistenciales normales de nuestro laboratorio, con el fin antes mencionado.

Por otra parte, y como se ha citado con anterioridad, el 2,5 % de las gestantes estudiadas por nosotros tenían el HBeAg positivo en el suero. Este hecho no concuerda exactamente con lo citado por Dragosics (187), Lohiya (188) y Szmunn (189), que indican unos porcentajes de positividad para el HBeAg de: 7,5 %, 16 % y 9,1 %, respectivamente. En lo que se refiere al antiHBe, el 90 % de las mujeres portadoras de nuestro estudio presentaban dicho anticuerpo positivo en el suero, porcentaje que concuerda con los citados por Dragosics (187) y Szmunn (189), que indican cifras similares, 90 % y 90,1 %. No sucede así con el estudio llevado a cabo por Lohiya (188), dado que se realizó en una institución para enfermos retrasados mentales, parte de

los cuales padecían un síndrome de Down y se conoce que estos pacientes presentan alteraciones importantes del sistema inmune que, evidentemente pueden alterar la casuística encontrada (antiHBe: 78 %). Asimismo, los resultados de nuestro estudio no concuerdan con los de los autores citados en lo que se refiere a la ausencia del HBeAg y antiHBe en el suero. De nuestro trabajo se deduce un porcentaje del 7,5 % para este punto, mientras que para Dragosics (187) es del 2,5 %, para Lohiya (188) es del 6 % y el de Szmuness (189) es de un 0,8 %. Los datos de concordancia y discrepancias citados pueden provenir de los distintos orígenes de los sujetos estudiados. Así, nuestra población se puede considerar homogénea, mientras que el resto presenta variaciones de edad, sexo, raza y algún otro factor, ya mencionado (S. de Down).

Teniendo en cuenta la descripción del virus Delta ya realizada y las características poco comunes del mismo, como son la asociación al VHB para producir infección asociada, en forma de coinfección o sobreinfección, según infecte al mismo tiempo que el VHB o lo haga en un portador crónico del mismo, y habida cuenta de la escasa bibliografía que de este agente viral existe en relación con la transmisión materno-fetal, en nuestro estudio se ha llevado a cabo la determinación de anticuerpos antiDelta en todas las gestantes HBsAg positivas, como ya se ha indicado. Del total de mujeres estudiadas se ha encontrado positivo el anticuerpo antiDelta en suero, en el 2,5 %. Este 2,5 % positivo para el antiDelta, era a su vez HBeAg positivo. Estos datos son similares a los encontrados por Arico y Rizzetto (190) en un estudio llevado a cabo en donantes de sangre, en el que encuentra un 5 % de sujetos con el anticuerpo antiDelta positivo. En el trabajo citado se indica que la presencia de antiDelta en suero identifica una subpoblación de portadores sanos del HBsAg con un riesgo de daño hepático cuatro veces mayor que los portadores antiDelta negativo.

Por otra parte, Smedile (191), en un trabajo publicado en el año 1981, sobre infección por el VHD en portadores crónicos del HBsAg, incluye a cinco niños nacidos de madres HBsAg positivas que presentaban a su vez anticuerpos antiDelta positivos en suero. Los niños nacidos de las madres que eran antiHBe positivas no mostraron evidencias de infección ni por el VHB ni el VHD y sí, en cambio, presentaban en suero los anticuerpos de clase IgG adquiridos de forma pasiva a través de la madre: antiHBc, antiHBe y antiDelta.

Por otro lado, el niño nacido de la única madre que era HBeAg positiva, sí mostró

evidencias de infección por el VHB y el VHD, tras el hallazgo del HBsAg y antiDelta de clase IgM en el suero del mismo. El citado autor concluye que la transmisión vertical del VHD ocurre bajo las mismas circunstancias que la transmisión vertical del VHB.

En nuestro trabajo, sin embargo, no se han observado evidencias de infección ni por el VHB ni por el VHD en el único caso encontrado de un niño nacido de madre con HBeAg y antiDelta positivos en suero.

Quizás sea debido a que en esta mujer se llevó a cabo una cesárea con lo que se evitó el parto, como posible fuente de infección viral. La cesárea fue indicada con criterios exclusivamente ginecológicos.

Por otra parte, se puede observar que el porcentaje total de DNA-VHB en las mujeres portadoras de nuestro estudio es del 52,5 %, dato que no concuerda con el obtenido por Genescá (192) que encuentra un 5 % y Negro (193) que encuentra un 26,4 %, mientras que Scotto (194) encuentra DNA-VHB en sujetos portadores, en el 38,7 % de los casos.

Al comparar los valores obtenidos en el presente trabajo, para el DNA-VHB en relación, con el HBeAg y antiHBe, con los encontrados en la bibliografía, para la misma determinación, podemos observar también datos discordantes. Así, en nuestro trabajo, el 100 % de las mujeres HBeAg positivas presentaban DNA-VHB elevado en suero, al igual que las mujeres que no presentaban HBeAg ni antiHBe. Asimismo, el 47,2 % de las mujeres que tenían positivo el antiHBe, también mostraban unos valores elevados para el DNA-VHB. Genescá (192) no cita ningún caso de antiHBe positivo con DNA-VHB positivo; Negro (193) indica un porcentaje de antiHBe positivo con DNA-VHB positivo del 26,4 %. Este autor tan sólo ha estudiado sujetos con el HBsAg y el antiHBe positivos en suero. Scotto (194) no cita porcentaje alguno sobre los datos encontrados pero sí indica que existe un gran número de portadores de HBsAg y HBeAg con DNA-VHB positivo, lo cual no quiere decir que no exista DNA-VHB libre en el suero de sujetos con antiHBe, y que es evidente que en los casos que son HBeAg positivos, el DNA-VHB está presente, así como en otros, que son antiHBe, aunque en estos últimos la concentración del DNA-VHB sea menor que en los anteriores.

Los resultados analizados y comparados con los datos bibliográficos en lo que se

refiere al DNA-VHB y al sistema antígeno-anticuerpo E, no concuerdan, como ya se ha citado. Una explicación posible sería la diferente metodología empleada para la determinación del DNA-VHB, así como en el resto de los marcadores séricos del VHB. Hay que resaltar, además, que el estudio que hemos llevado a cabo se ha hecho en un grupo homogéneo, a diferencia de los trabajos citados en la bibliografía. Esta característica se basa en que todos los casos eran mujeres, adultas, embarazadas, de la misma raza y residentes en la misma zona y no pertenecientes a ningún grupo de riesgo.

De los datos obtenidos para el DNA-VHB en las mujeres embarazadas, se puede deducir que este resultado es independiente, en nuestro estudio, del HBeAg, antiHBe, como ocurre a veces en hepatopatías crónicas en fase replicativa.

Asímismo, la actividad de la DNA-p en el suero de las mujeres portadoras de nuestro trabajo, fué negativa, mientras que algunos estudios (195), indican que la actividad DNA-p encontrada en portadores asintomáticos, era de un 6 %, indicando que los pacientes con HBeAg positivo en suero presentaban la DNA-p elevada en el 80 % de los casos, mientras que los sujetos con antiHBe positivo lo hacían sólo en un 9 %.

Ante estos valores pensamos que la actividad de DNA-p es negativa en nuestras mujeres portadoras del HBsAg, porque, como se ha comprobado en un estudio realizado en nuestra Unidad, cuando el DNA-VHB está elevado, la actividad de la DNA-p está disminuida, y porque además pensamos que las mujeres que no tienen el DNA-VHB libre en el suero, no presentan en ese momento replicación viral, con lo que no existe actividad alguna de DNA-p.

Se ha creído de interés determinar el anticuerpo frente al virus de la hepatitis C (antiVHC), habida cuenta de la parecida similitud que parece guardar dicho virus con el de la hepatitis B.

De nuestros datos se obtiene una prevalencia de antiVHC en el total de las mujeres del 3 %, mientras que en las mujeres portadoras del HBsAg se observa un porcentaje del 5 % y en las no portadoras un 2,7 %.

Estos datos difieren de los citados en la bibliografía. Así Esteban (143) indica,

en una población de mujeres gestantes portadoras del HBsAg, un porcentaje para el antiVHC del 1 %, y en las mujeres no portadoras, una cifra del 1,4 %. La prevalencia total según el trabajo citado es del 1,2 %.

De lo anterior se deduce que en el estudio realizado por nosotros en Sevilla existe una mayor prevalencia de antiVHC que en el llevado a cabo en Barcelona (143). Esta diferencia, aunque pequeña, puede ser debida a las características de nuestra población, como son la edad, sexo, procedencia, etc. Aunque es posible también, que en nuestra zona, por razones geográficas, se de una mayor prevalencia para este virus.

Asímismo, hay que destacar el hecho de que en un estudio realizado en donantes de sangre por Ercilla (196), en el año 1989, España es el país donde se observa una mayor prevalencia para el antiVHC (2,2 %), en comparación con los datos presentados por otros países como Estados Unidos (0,6 %), Finlandia (0,23 %), Suiza (0,34 %), Alemania (0,42 %), Dinamarca (0,42 %), Holanda (0,72 %), Italia (1,5 %) y Hungría (1,73 %).

Estas cifras han sido presentadas en el transcurso del First International Symposium Hepatitis C Virus, celebrado el mes de Septiembre del año 1989, en Roma, y apoyan la hipótesis citada por nosotros con anterioridad.

No se pueden olvidar algunos comentarios de autores en los que se mencionan que con la técnica actual para la determinación de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C, podrían aparecer porcentajes no despreciables de resultados positivos falsos para dicho anticuerpo. Este problema se resolverá cuando sea posible confirmar los datos serológicos del VHC, determinando otros marcadores del virus.

Ante la falta de datos bibliográficos sobre la prevalencia de antiVHC en mujeres embarazadas con actividad de ALT elevada en el suero y antiHBc positivo, se ha recurrido a la comparación de los valores encontrados en el grupo de mujeres de nuestro estudio con una población de sujetos donantes de sangre.

En nuestro trabajo se encuentra un porcentaje de mujeres con ALT elevada y antiVHC positivo de un 4,4 %, mientras que las mujeres antiHBc y antiVHC positivas eran un 3,7 %. Los valores para la ALT-antiVHC concuerdan con los presentados por

Aneloni (197) para Italia, mientras que no coincide con los datos aportados para el antiHBc y antiVHC (7,3 %). La discordancia en este punto, quizás sea debida a la heterogeneidad ya citada de los grupos comparados.

Aunque es cierta la similitud que se observa entre la hepatitis B y la hepatitis C, en lo que se refiere a transmisión del virus, formas clínicas, tendencia a la cronicidad, etc., quedan todavía muchos interrogantes sobre la epidemiología, estructura y otros muchos aspectos del VHC, y estamos seguros que en un breve espacio de tiempo podrán ser conocidos y aplicados a la clínica. Desde los años 70 se piensa que pueda existir una posible transmisión vertical para el virus de la HNANB. Así, Gupta (198), en el año 1978, describe un caso de transmisión materno-fetal de una posible HNANB en el que la madre y el niño presentaron toda la serología vírica negativa en el suero y en el tejido hepático, con aminotransferasas séricas elevadas y una sintomatología evidente de hepatitis aguda. Este hecho podría indicar una posible transmisión vertical del VHC, al igual que sucede con el VHB.

Dado que el desarrollo de la Medicina Preventiva en lo que se refiere a la profilaxis del recién nacido de madre portadora del HBsAg, es hoy muy claro, ya que tratan de proteger, de forma activa y pasiva a todos los recién nacidos, sea cual sea su estado serológico, en el momento del nacimiento, tiene poco interés en la actualidad el estudio de la sangre de cordón a fin de establecer algún criterio preventivo respecto al niño.

A pesar de ello, se ha realizado el estudio de los marcadores serológicos del VHB en 32 muestras obtenidas de sangre del cordón de los correspondientes recién nacidos. Nuestros resultados no concuerdan con los encontrados en la bibliografía, dado que estos estudios se llevaron a cabo en regiones distintas a la nuestra en cuanto a la prevalencia del VHB. Así, hemos encontrado un 15,6 % de casos positivos para el HBsAg, el 100 % de antiHBc-IgG, 0 % de antiHBc-IgM y 0 % de antiHBs. Se pudo observar que el título de HBsAg en sangre del cordón era inferior al materno y que asimismo, el HBsAg desapareció en todos los casos al mes de edad, excepto en un caso que lo hizo a los dos meses. Todo ello puede indicar, entre otras cosas, que el HBsAg provenga de la madre o que haya podido desaparecer a consecuencia de la administración de la HBIG.

Wong (65), encontró positivo el HBsAg en sangre del cordón en el 67,4 % de las

muestras analizadas y no indica ninguna relación entre estos datos y el estado de portador crónico. Marinier (46), en un trabajo realizado en Senegal, indica que no aparecen marcadores del VHB en las 1358 muestras de sangre de cordón que estudió; ninguno de los niños fué HBsAg positivo antes de los cinco meses de edad, lo cual desecha la existencia de transmisión vertical para el citado autor.

Por otra parte, Panda (199) encuentra títulos elevados de antiHBc-IgG en sangre del cordón de niños nacidos de madres portadoras del HBsAg, lo cual coincide con nuestros resultados para dicho marcador. En este estudio se encuentra positivo el antiHBc-IgM en sangre del cordón en el 7,5 % de los casos. Para Stevens (200), entre el 15 y el 20 % de los niños nacidos de madres HBsAg positivas presentan dicho antígeno en la sangre del cordón e indica que este hecho supone, casi siempre, una contaminación a partir de la sangre materna. Botha (201) encuentra un 80 % de HBsAg positivo en sangre del cordón y lo atribuye también a una posible contaminación por la sangre de la madre, aunque carece de datos ulteriores que confirmen este hecho. Hyams (202) encuentra, asimismo, un 54 % de HBsAg positivo en sangre del cordón, sin la presencia de antiHBc-IgM en ningún caso. Por último, Papaevangelou (76) encuentra un 20 % de HBsAg, 0 % de antiHBs y 100 % de antiHBc-IgG, en sangre del cordón, y sus casos con HBsAg positivo en sangre del cordón no presentaban este antígeno en el suero de los niños a los 3 meses de edad, como sucede en nuestro estudio.

Como puede observarse, existe una gran disparidad de porcentajes entre nuestros datos y los encontrados en la bibliografía, referentes a la serología del VHB en la sangre del cordón. Hoy día, se desecha esta determinación, habida cuenta de los criterios preventivos que se han impuesto prácticamente en todos los hospitales.

Las madres de los cinco niños que tenían el HBsAg positivo en sangre del cordón, presentaban a su vez, actividad normal de las aminotransferasas séricas, el antiHBe era positivo en el suero de todas ellas y el DNA-VHB sólo era positivo en tres de los casos (Nº 3, 10 y 14).

Deducimos que siendo el DNA-VHB el parámetro por excelencia de replicación del VHB, no influye de forma decisiva, en nuestro estudio, sobre la presencia del HBsAg en la sangre del cordón, a diferencia de Virgilis (59), que indica que la transmisión de la infección por el VHB en los recién nacidos está en estrecha relación con la presencia

del DNA-VHB en el suero de las madres.

Llaman la atención los casos 8 y 17, porque en la sangre del cordón no presentan HBsAg, a pesar de los altos niveles de DNA-VHB detectados en el suero de las madres. El caso 8, se puede considerar excepcional, puesto que se trata de un niño con el antiHBc-IgG y antiDelta positivos en sangre del cordón, mientras que su madre presentaba HBsAg, HBeAg, antiHBc, antiDelta y DNA-VHB positivos, junto con actividad elevada de las aminotransferasas séricas (AST y ALT).

En resumen, los hallazgos serológicos en la sangre del cordón no arrojan ninguna luz sobre la infección por el VHB en el recién nacido, dada la gran discrepancia encontrada en la bibliografía a este respecto. Sí hemos de señalar que, como se indica en otros trabajos, el antiHBc encontrado procede, la mayoría de las veces, de la madre portadora, al igual que sucede con el resto de los anticuerpos (antiHBe y antiDelta) y probablemente con el HBsAg.

De las 40 mujeres embarazadas, portadoras del HBsAg, 32 dieron a luz en nuestro hospital y sus hijos recibieron el tratamiento profiláctico combinado (inmunización pasiva y activa) frente a la hepatitis B, según las recomendaciones del Immunization Practices Advisory Committee (Centers for Disease Control) (203). Las personas que conviven con dichas mujeres (cónyuges e hijos anteriores) recibieron también el correspondiente tratamiento profiláctico.

Los datos con los que contamos hasta el momento, indican la presencia del antiHBs en suero, en el 100 % de los recién nacidos, 83,3 % de los cónyuges y el 100 % de los hijos anteriores.

La tasa media de seroconversión, después de la administración de la vacuna, es muy próxima al 100 %, lo que garantiza la protección frente a la infección por el VHB en las familias estudiadas. Ello supone un paso adelante en el control de la hepatitis B.

## **V.- CONCLUSIONES**

- 1: De las 2600 mujeres gestantes estudiadas en el presente trabajo, el 1,5 % son portadoras del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.
- 2: La prevalencia de marcadores del virus de la hepatitis B en el suero de los familiares de las mujeres portadoras ha sido elevada (54,8 %).
- 3: El porcentaje de portadores encontrado en la segunda generación, con respecto a la tercera, indica que la transmisión horizontal es, en nuestro estudio, mucho más frecuente que la transmisión vertical.
- 4: Existe una disminución evidente, en lo que se refiere al estado de portador crónico y a la presencia de marcadores del virus de la hepatitis B, entre la primera, segunda y tercera generación. Asimismo existe un aumento en cuanto a la ausencia de marcadores del virus de la hepatitis B entre las tres generaciones citadas.
- 5: El contacto con el virus de la hepatitis B en cada generación se va reduciendo espontáneamente, en un porcentaje aproximado al 50 %. Quizás este hecho sea debido a la mejora de las condiciones higiénico-sociales, a lo largo de la vida de las tres generaciones estudiadas.
- 6: La determinación del DNA del virus de la hepatitis B en las mujeres portadoras y su presencia o ausencia, no influye en la prevalencia de marcadores del virus de la hepatitis B de sus familiares. Asimismo no se ha relacionado con el antígeno E de la hepatitis B y su anticuerpo.
- 7: Con respecto a la determinación de anticuerpos frente al virus de la hepatitis C, se ha encontrado que un 3 % de las mujeres estudiadas presentaban este marcador positivo.
- 8: Es necesario, a la vista de la poca información aportada por la encuesta epidemiológica, realizar el estudio serológico del virus de la hepatitis B en todas las mujeres embarazadas. Dicho estudio se debe comenzar con la determinación del anticuerpo frente al antígeno del core del virus de la hepatitis B, y se continuará según los criterios ya citados a lo largo del presente trabajo. Por el contrario, el estudio serológico de la sangre del cordón no resulta de utilidad a la hora de enjuiciar o

adoptar medidas inmunoprolácticas.

Está por lo tanto indicado el tratamiento proláctico de los recién nacidos, dado el alto porcentaje de seroconversión observado en los mismos, al igual que en los familiares que conviven con la mujer portadora.

## **VI.- BIBLIOGRAFIA**

1. ALLISON AC, BLUMBERG BS. An isoprecipitation reaction distinguishing human serum-protein types. *Lancet* 1961; 1: 634-637.
2. BLUMBERG BS, ALTER HJ, VISNICH S. A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 1965; 191: 541-546.
3. BLUMBERG BS, PHILD, GERSTLEY BJS, HUNGENFORD DA, LONDON WT, SUTNICK AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's Syndrome, leukemia and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967; 66: 924-928.
4. PRINCE AM. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Nat Acad Sci USA* 1968; 60: 814-819.
5. BAYER ME, BLUMBERG BS, WERNER B. Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukemia, Down's Syndrome and hepatitis. *Nature* 1968; 318: 1057-1059.
6. DANEDS, CAMERON CH, BRIGGS M. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen associated hepatitis. *Lancet* 1970; 1: 695-698.
7. MAGNIUS LO. New specificities in Australia antigen positive sera distinct from Le Bouvier determinants. *J Immunol* 1972; 109: 1017-1021.
8. MAGNIUS LO. Characterization of a new antigen-antibody system associated with hepatitis B. *Clin Exp Immunol* 1975; 20: 209-216.
9. RIZZETTO M, CANESE MG, ARICO S. Immunofluorescence detection of a new antigen/antibody system (Delta/antiDelta) associated with hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977; 18: 997-1003.
10. SUMMERS J. The recently described animal virus models for human hepatitis B virus. *Hepatology* 1981; 1: 179-183.
11. TIOLLAIS P, POURCEL C, DEJEAN A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-495.

12. TIOLLAISP, CHARNAYP, VYAS GN. Biology of hepatitis B virus. *Science* 1981; 213: 406-411.
13. RIZZETTO M. The Delta agent. *Hepatology* 1983; 5: 729-737.
14. GANEM D, VARMUS HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987; 56: 651-693.
15. ZUCKERMAN AJ. Perinatal transmission of hepatitis B. *Arch Dis Child* 1984; 59: 1007-1009.
16. SZMUNESS W. Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B virus: evidence for a casual association. *Prog Med Virol* 1978; 24: 40-69.
17. BEASLEYRP, HWANGLY, LIN CC, CHIEN CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2: 1129-1133.
18. PRINCE AM, ALCABES P. The risk of development of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus carriers in New York. A preliminary estimate using Death-Records matching. *Hepatology* 1982; 2: 15S-20S.
19. SUMMERS J, SMOLEC MJ, SNYDER R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 4533-4537.
20. SHAFRITZ DA, SHOUVALD, SHERMANHI, HADZIYANNISSJ, KEWMC. Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1981; 305: 1067-1073.
21. RIZZETTO M, PURCELL RH, GERIN JL. Epidemiology of HBV associated delta antigen: geographical distribution and prevalence in polytransfused HBsAg carriers. *Lancet* 1980; 1: 1215-1218.

22. SMEDILE A, LAVARINI C, ARICO S. Epidemiological patterns of infection with the hepatitis B virus associated delta agent in Italy. *Am J Epidemiol* 1983; 117: 223-229.
23. RAIMONDO G, SMEDILE A, GALLO L, BALBO A, PONZETTO A, RIZZETTO M. Multicentre study of prevalence of HBV-associated delta infection and liver disease in drug-addicts. *Lancet* 1982; 1: 245-251.
24. HADLER SC, MONZON M, PONZETTO A, ANZOLA E, RIVERO D, MONDOLFI A, BRACHO A, FRANCIS DP, GERBER MA, THUNG S, GERIN J, MAYNARD JE, POPPER H, PURCELL RH. Delta virus infection and severe hepatitis: an epidemic in the Yucpa Indians of Venezuela. *Ann Intern Med* 1984; 100: 339-344.
25. WARD R, BORCHERT P, WRIGHT A, KLINE E. Hepatitis B antigen in saliva and mouth washings. *Lancet* 1972; 1: 726-727.
26. HEATHCOTE J, CAMERON CH, DANE DS. Hepatitis B antigen in saliva and semen. *Lancet* 1974; 1: 71-73.
27. OSTERHOLM MT, BRAVO ER, CROSSON JT, POLISKY HF, HANSON M. Lack of transmission of viral hepatitis type B after oral exposure to HBsAg-positive saliva. *Br Med J* 1979; 2: 1263-1264.
28. SCOTT RM, SNITBHAN R, BANCROFT WH, ALTER HJ, TINGPALA-PONG M. Experimental transmission of hepatitis B virus by semen and saliva. *J Infect Dis* 1980; 142: 67-71.
29. ALTER HJ, PURCELL RH, GERIN JL, LONDON WT, KAPLAN PM, McAULIFFE VJ, WAGNER J, HOLLAND PV. Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen-positive saliva and semen. *Infect Immun* 1977; 16: 928-933.
30. BROTMAN B, PRINCE AM, GODFREY HR. Role of arthropods in transmission of hepatitis B virus in the tropics. *Lancet* 1973; i: 1305-1308.

31. KOFF RS, SLAVIN MM, CONNELLY LJD, ROSEN DR. Contagiousness of acute hepatitis B. Secondary attack rates in household contacts. *Gastroenterology* 1977; 72: 297-300.
32. FULFORD KWM, DANE DS, CATTERALL RD, WOOF R, DENNING JV. Australia antigen and antibody among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. *Lancet* 1973; 1: 1470-1473.
33. DIETZMAN DE, HARNISCH JP, RAY CG, ALEXANDER ER, HOLMES KK. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) and antibody to HBsAg: Prevalence in homosexual and heterosexual men. *JAMA* 1977; 238: 2625-2626.
34. DARANI M, GERBER M. Hepatitis B antigen in vaginal secretions. *Lancet* 1974; 2: 1008.
35. SCHWEITZER IL, SPEARS RL. Hepatitis-associated antigen (Australia antigen) in mother and infant. *New Engl J Med* 1970; 283: 570-572.
36. GILLESPIE A, DORMAN D, WALKER-SMITH JA, YU JS. Neonatal hepatitis and Australia Antigen. *Lancet* 1970; 2: 1081.
37. GARTYR, BAR-SCHANT S, GORDIN A. Possible transplacental transmission of serum hepatitis. *Lancet* 1971; 2: 434-436.
38. TURNER GC, FIELD AM, LASHEEN RM, TOOD RM, WHITE GBB, PORTER AA. SH (Australia) antigen in early life. *Arch Dis Child* 1971; 46: 616-621.
39. MERRILL DA, DUBOIS RS, KHOLER PF. Neonatal onset of the hepatitis-associated antigen carrier state. *N Engl J Med* 1972; 287: 1280-1282.
40. STEVENS CE, BEASLEY RP, TSUI J, LEE WC. Vertical transmission of hepatitis B antigen in Taiwan. *N Engl J Med* 1975; 292: 771-774.
41. DERSO A, BOXALLE, TARLOW MJ, FLEWETT TH. Transmission of HBsAg from mother to infant in four ethnic groups. *Br Med J* 1978; 1: 949-952.

42. BARIN F, PERRIN J, CHOTARD J, DENIS F, N'DOYE R, DIOPMAR I, CHIRON JP, COURSAGET P, GOUDEAU A, MAUPAS P. Cross-sectional and longitudinal epidemiology of hepatitis B in Senegal. *Prog Med Virol* 1981; 27: 148-162.
43. PRINCE AM, WHITE T, POLLOCK N, RIDDLE J, BROTMAN B, RICHARDSON L. Epidemiology of hepatitis B infection in Liberian infants. *Infect Immun* 1981; 32: 675-680.
44. BEASLEY RP, HWANG LY, LIN CC, LEU ML, STEVENS CE, SZMUNESS W, CHEN KP. Incidence of hepatitis B virus infections in preschool children in Taiwan. *J Infect Dis* 1982; 146: 198-204.
45. WHITTLE HC, BRADLEY AK, McLAUCHLAN K, AJDUKIEWICZ AB. Hepatitis B virus infection in two Gambian villages. *Lancet* 1983; 1: 1203-1206.
46. MARINIER E, BARROIS V, LAROUZE B, LONDON T, COFER A, DIAKHATE L, BLUMBERG BS. Lack of perinatal transmission of hepatitis B virus infection in Senegal (West Africa). *J Pediat* 1985; 106: 843-849.
47. SCHWEITZER IL. Vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Med Sci* 1975; 270: 287-291.
48. ROSENDAHL C, KOCHEN MM, KRETSCHMER R, WEGSCHEIDER K, KAISER D. Avoidance of perinatal transmission of hepatitis B virus: Is passive immunization always necessary?. *Lancet* 1983; 1: 1127-1129.
49. BHARUCHA C, CROWLEY D, McCLELLAND M, CRAWFORD RJ. Perinatal transmission of hepatitis B in Northern Ireland. *Br Med J* 1983; 286: 439-444.
50. DELAPLANE D, YOGEV R, CRUSSI F, SHULMAN ST. Hepatitis B mortal en la fase precoz de la infancia. Importancia de la identificación de las gestantes con HBsAg positivo y de la inmunoprofilaxis de sus hijos. *Pediatrics* 1983; 16: 107-111.

51. GENESCA J, ESTEBAN R. Inmunoprofilaxis de la transmisión vertical del virus de la hepatitis B. Una necesidad urgente. *Med Clin (Barc)* 1986; 86: 63-64.
52. OKADA D, KAMIYAMA I, INOMATA M, IMAI M, MIYAKAWA Y, MAYUMI M. The e antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N Eng J Med* 1976; 294: 746-749.
53. BEASLEY RP, TREPO C, STEVENS CE, SZMUNESS W. The e antigen and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Am J Epidemiol* 1977; 105: 94-98.
54. STEVENS CE, NEURATH RA, BEASLEY RP. HBeAg and antiHBe detection by radioimmunoassay: correlation with vertical transmission of hepatitis B virus in Taiwan. *J Med Virol* 1979; 3: 237-240.
55. ALDERSHVILE J, SKINHOJ P, FROSNER GC, BLACK F, DEINHARDT F, HARDT F, NIELSEN JO. The expression pattern of hepatitis B e antigen and antibody in different ethnic and clinical groups of hepatitis B surface antigen carriers. *J Infect Dis* 1980; 142: 18-22.
56. HWANG LY. Perinatal transmission of hepatitis B virus: Role of maternal HBeAg and antiHBc IgM. *J Med Virol* 1985; 15: 265-271.
57. CHEN DS, HSU NHM, SUNG JL, HSU TC, HSU ST, KUO YT, LO KJ, SHIH YT. A mass vaccination program in Taiwan against hepatitis B virus infection in infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *JAMA* 1987; 257: 2597-2603.
58. HEIJTINK RA, BOENDER PJ, SCHALMSW. Hepatitis B virus DNA in serum of pregnant women with HBsAg and HBeAg or antibodies to HBe. *J Infect Dis* 1984; 150: 462-470.
59. DE VIRGILISS, FRAUF, SANNAG, TURCOMP, FIGUSAL, CORNACCHIA G, CAO A. Perinatal hepatitis B virus detection by hepatitis B virus-DNA analysis.

Arch Dis Child 1985; 60: 56-60.

60. LEE SD, LO KJ, WU JC, TSAI YT, WANG JY, TING LP, TONG MJ. Prevention of maternal-infant hepatitis B virus transmission by immunization: The role of serum hepatitis B virus DNA. *Hepatology* 1986; 6: 369-373.
61. PAPA EVANGELOU G, HOOFNAGLE JH. Transmission of hepatitis B virus infection by asymptomatic chronic HBsAg carrier mothers. *Pediatrics* 1979; 63: 602-606.
62. SHIRAKI K, YOSHIHARA N, SAKURAI M, ETO T, KAWANA T. Acute hepatitis B in infants born to carrier mother with the antibody to hepatitis B e antigen. *J Pediatr* 1980; 97: 768-770.
63. LEE AKY, IP HMH, WONG VCW. Mechanisms of maternal-fetal transmission of hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1978; 138: 668-671.
64. WONG VCW, LEE AKY, IP HMH. Transmission of hepatitis B antigens from symptom-free carrier mothers to the fetus and the infant. *Br J Obstet Gynecol* 1980; 87: 958-965.
65. WONG VCW, IP HMH, REESINK HW, LELIE PN, REERINK-BRONGERS EE, YEUNG CY, MA HK. Prevention of the HBsAg carrier state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBsAg and HBeAg by administration of hepatitis B vaccine and hepatitis B immunoglobulin. *Lancet* 1984; 1: 921-926.
66. MILNE A. Transplacental transmission of hepatitis B virus. *Lancet* 1986; 1: 860-861.
67. LI L, SHENG MH, TONG SP, CHEN HZ, WEN YM. Transplacental transmission of hepatitis B virus. *Lancet* 1986; 2: 872.
68. ALEXANDER GJM, EDDLESTON ALWF. Does maternal antibody to core antigen prevent recognition of transplacental transmission of hepatitis B virus infection?. *Lancet* 1986; 1: 296-297.

69. LINNEMAN CC, GOLBERG S. HBsAg in breast milk. *Lancet* 1974; 1: 155.
70. BOXALL EH. Breast feeding and hepatitis B. *Lancet* 1975; 2: 979.
71. BEASLEY RP, STEVENS CE, SHIAO IS, MENG HC. Evidence against breast feeding as a mechanism for vertical transmission of hepatitis B. *Lancet* 1975; 2: 740-741.
72. CHIN J. Prevención de la transmisión de la infección crónica por el virus de la hepatitis B de madres a hijos en los EEUU. *Pediatrics* 1983; 15: 79-82.
73. MARTINO M, APPENDINO C, RESTI M, ROSSI ME, MUCCIOLI AT, VIERUCCI A. Should hepatitis B surface antigen positive mothers breast feed?. *Arch Dis Child* 1985; 60: 972-974.
74. SNYDMAN DR. Hepatitis in pregnancy. *N Engl J Med* 1985; 313: 1398-1401.
75. SCHWEITZER IL, MOSLEY JW, ASHCAVAIM, EDWARDS VM, OVERBY LB. Factors influencing neonatal infection by hepatitis B. *Gastroenterology* 1973; 65: 277-283.
76. PAPAEVANGELOU G, HOOFNAGLE J, KREMASTINOJ. Transplacental transmission of hepatitis B virus by symptom free chronic carrier mothers. *Lancet* 1974; 2: 746-748.
77. MOLLICA R, MUSUMECI S, RUGOLO S, MATTINA T. A prospective study of 18 infants of chronic HBsAg mothers. *Arch Dis Child* 1979; 54: 750-754.
78. GOUDEAU A, IVONNET B, LESAGE G, BARINF, DENISF, COURSAGET P, CHIRON JP, DIOPMAR I. Lack of antiHBc-IgM in neonates with HBsAg carrier mothers argues against transplacental transmission of hepatitis B virus infection. *Lancet* 1983; 2: 1103-1104.
79. PEDREIRA JD, VARGAS V, ESTEBAN R, HERNANDEZ JM, GUARDIA J, BACARDI R. Transmisión placentaria de anticuerpos contra el virus de la

hepatitis B. *Med Clin (Barc)* 1982; 79: 256-257.

80. JIMENEZ M, MARTINEZ MC, PINEDA A, HERRERIAS JM, GARRIDO M. Estudio epidemiológico de la inmunidad pasiva transplacentaria frente a los virus A y B de la hepatitis. *Gast y Hep* 1983; 6: 283-285.
81. SHALEV E, BASSAN HM. Viral hepatitis during pregnancy in Israel. *Int J Gynaecol Obstet* 1982; 20: 73-78.
82. BEASLEY RP. Hepatitis B virus as the etiologic agent in hepatocellular carcinoma. Epidemiologic considerations. *Hepatology* 1982; 2: 21S-26S.
83. SASAKI T, HATTORI F, MAYUMI M. A large scale survey on the prevalence of HBeAg and antiHBe among asymptomatic carriers of HBV. Correlation with sex, age, HBsAg titre and s-GPT value. *Vox Sang* 1979; 37: 216-221.
84. BORTOLOTTI F, CADROBBI P, ARMIGLIATO M, RUDE L, RUGGE M, REALDI G. Prognosis of chronic hepatitis B transmitted from HBsAg positive mothers. *Arch Dis Child* 1987; 62: 201-203.
85. BORTOLOTTI F, CADROBBI P, CRIVELLARO C, ALBERTIA, RUGGE M, BERTAGGIA A, REALDI G. Changes in hepatitis Be antigen/antibody system in children with chronic hepatitis B virus infection. *J Pediatr* 1983; 103: 718-722.
86. MAGGIORE G, GIACOMO C, MARZANI D, SESSA F, SCOTTAMS. Chronic viral hepatitis B in infancy. *J Pediatr* 1983; 103: 749-752.
87. CHANG MH, HWANG LY, HSU HC, LEE CY, BEASLEY RP. Prospective study of asymptomatic HBsAg carrier children infected in the perinatal period: clinical and liver histologic studies. *Hepatology* 1988; 8: 374-377.
88. HSU HC, LIN YH, CHANG MH, SU IJ, CHENG DS. Pathology of chronic hepatitis B virus infection in children: with special reference to the intrahepatic expression of hepatitis B virus antigens. *Hepatology* 1988; 8: 378-382.

89. BEASLEY RP, SHIAO IS, WU TC, HWANG LY. Hepatoma in an HBsAg carrier-seven years after perinatal infection. *J Pediatr* 1982; 101: 83-84.
90. CHUNG T, TONG MJ, HWANG B, LEE SD, HU MM. Primary hepatocellular carcinoma and hepatitis B infection during childhood. *Hepatology* 1987; 7: 46-48.
91. EWING CI, DAVIDSON DC. Fatal hepatitis B in infant born to a HBsAg carrier with HBeAb. *Arch Dis Child* 1985; 60: 265-267.
92. SINATRA FR, SHAH P, WEISSMAN JY, THOMAS DW, MERRITT RJ, TONG MJ. Perinatal transmitted acute icteric hepatitis B in infants born to hepatitis B surface antigen-positive and antihepatitis Be positive carrier mothers. *Pediatrics* 1982; 70: 557-559.
93. CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Recommendations for protection against viral hepatitis. *Ann Intern Med* 1985; 103: 391-402.
94. KRUGMAN S, GILES JP, HAMMOND J. Viral hepatitis type B (MS-2 strain): studies on active immunization. *JAMA* 1971; 217: 41-45.
95. MAUPAS P, GOUDEAU A, COURSAGET P, DRUCKER J, BAGROS P. Immunization against hepatitis B in man. *Lancet* 1976; 1: 1367-1369.
96. BUYNAK EB, ROEHM RR, TYTELL AA, BERTLAND AU, LAMPSON GP, HILLEMANN MR. Vaccine against human hepatitis B. *JAMA* 1976; 235: 2832-2834.
97. HILLEMANN MR, BERTLAND AU, BUYNAK EB. Clinical & Laboratory studies of HBsAg vaccine. In: VYAS GN, COHEN SN, SCHMID R, eds. *Viral hepatitis: A contemporary assesment of etiology, epidemiology, pathogenesis & prevention*. The Franklin Inst. Press. 1978: 525-537.
98. VALENZUELA P, MEDINA A, RUTTER WJ, AMMERER G, HALL BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature Lond* 1982; 298: 347-354.

99. POURCEL C, DROVET J, TIOLLAIS P. Antigenicity and immunogenicity of hepatitis B virus particles produced by mouse cells transfected with cloned viral DNA. *Virology* 1982; 121:175-180.
100. MICHEL ML, PONTISSO P, SOBZACK E. Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 7708-7712.
101. PURCEL RH, GERIN JL. Prospects for second and third generation hepatitis B vaccines. *Hepatology* 1985; 5: 159-163.
102. ZUCKERMAN AJ. New hepatitis B vaccines. *Br Med J* 1985; 290: 492-496.
103. IWARSON S, TABOR E, THOMAS HC, SNOY P, GERETY RJ. Protection against hepatitis B virus infection by immunization with hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1985; 88: 763-767.
104. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. Real Decreto 3179/1983, del 23 de Noviembre, en el que se regula el suministro, la distribución, prescripción y control de la administración de la vacuna contra la hepatitis B. En: *Boletín Oficial del Estado*, Nº 310, 28 Diciembre 1983: 34706-34708.
105. ZUCKERMAN AJ. Brief report of the World Health Organization: Production of hepatitis B vaccine from yeast. *J Med Virol* 1985; 15: 211-212.
106. STEVENS CE, TAYLOR PE. Hepatitis B vaccine: issues recommendations and new developments. *Semin Liver Dis* 1986; 6:23-27.
107. DAVIDSON M, KRUGMANS. Recombinant yeast hepatitis B vaccine compared with plasma-derived vaccine: Immunogenicity and effect of a booster-dose. *J Infect Dis* 1986; 13: 31-39.
108. CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). Hepatitis B vaccine: Evidence confirming lack of AIDS transmission. *MMWR* 1984;33: 685-687.

109. CENTERS FOR DISEASE CONTROL (CDC). The safety of hepatitis B virus vaccine. *MMWR* 1983; 32: 134-136.
110. REESINK HW, REERINK-BRONGERSEE, LAFEVER-SCHUTBJT. Prevention of chronic HBsAg carrier state in infants of HBsAg-positive mothers by hepatitis B immunoglobulin. *Lancet* 1979; 1: 436-438.
111. NAIR PV, WEISSMAN JY, TONG MJ, THURSBY MW, PAUL RH, HENNE-MAN CE. Efficacy of hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal transmission of the hepatitis B virus. *Gastroenterology* 1984; 87: 293-298.
112. FOSCHINI M, TONIA, PADULA D, PIZZOCOLO G, ARRIGHINI A, ZUNIN C. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infection by hepatitis B immunoglobulin immunoprophylaxis: An account of 201 newborn babies of hepatitis B antigen carrier mothers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985; 4: 523-527.
113. TONG MJ, NAIR PV, THURSBY M, SCHWEITZER IL. Prevention of hepatitis B infection by hepatitis B immune globulin in infants born to mothers with acute hepatitis during pregnancy. *Gastroenterology* 1985; 89: 160-164.
114. BEASLEY RP, HWANG LY, LIN CC, STEVENS CE, WANG KY, SUN TS, HSIEH FJ, SZMUNESS W. Hepatitis B immune globulin (HBIG) efficacy in the interruption of perinatal transmission of hepatitis B virus carrier state. Initial report of a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Lancet* 1981; 2: 388-393.
115. BEASLEY RP, HWANG LY, STEVENS CE, LIN CC, HSIEH FJ, WANG KY, SUN TS, SZMUNESS W. Efficacy of hepatitis B immune globulin for prevention of perinatal transmission of the hepatitis B virus carrier state: Final report of a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Hepatology* 1983; 3: 135-141.
116. MAUPAS P, CHIRON JP, BARIN F, COURSAGET P, GOUDEAU A, PERRIN J, DENIS F, DIOPMAR I. Efficacy of hepatitis B vaccine in prevention of early HBsAg carrier state in children. Controlled trial in an endemic area (Senegal).

Lancet 1981; 1: 289-292.

117. BARIN F, GOUDEAU A, DENIS F, YVONNET B, CHIRON JP, COURSA-GET P, DIOPMARI. Immune response in neonates of hepatitis B vaccine. Lancet 1982; 1: 251-253.
118. LEE GC, HWANG LY, BEASLEY RP, CHEN SH, LEE TY. Immunogenicity of hepatitis B virus vaccine in healthy chinese neonates. J Infect Dis 1983; 148: 526-529.
119. IP HMH, WONG VCW, LELIE PN, REESINK HW. Should the dose of hepatitis B vaccine be reduced in newborn babies?. Lancet 1986; 1: 43-44.
120. YVONNET B, COURSAGET P, LEBoulLEUX D, BARRES JL, FRITZELL B, SAAR G, CHIRON JP, DIOPMARI I. Vacuna de la hepatitis B a dosis bajas en niños. Lancet 1987; 10: 381.
121. MOYES CD, MILNE A, DIMITRAKAKIS M, GOLDWATER PN, PEARCE N. Vacuna contra la hepatitis B a dosis muy bajas en los recién nacidos: Una opción económica para el control de la enfermedad en áreas endémicas. Lancet 1987; 10: 359-362.
122. TADA H, YANAGIDA M, MISHINA J, FUJII T, BABA K, ISHIKAWA S, AIHARAS, TSUDA F, MIYAKAWA Y, MAYUMI M. Combined passive and active immunization for preventing perinatal transmission of hepatitis B virus carrier state. Pediatrics 1982; 70: 613-619.
123. BEASLEY RP, HWANG LY, LEE GCY, LAN CC, ROAN CH, HUANG FY, CHEN CL. Prevention of perinatally transmitted hepatitis B virus infections with hepatitis B immune globulin and hepatitis B vaccine. Lancet 1983; 2: 1099-1102.
124. CHUNG WK, YOO JY, SUN HS, LEE HY, LEE IJ, KIM SM, PRINCE AM. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus: A comparison between the efficacy of passive and passive-active immunization in Korea. J Infect Dis 1985;

151: 280-286.

125. LO KJ, TSAI YT, LEE SD, YEH CL, WANG JY, CHIANG BN, WU TC, YEH SH, GOUDEAU A, COURSAGET P, TONG MJ. Combined passive and active immunization for interruption of perinatal transmission of hepatitis B virus in Taiwan. *Hepato-gastroenterol* 1985; 32: 65-68.
126. STEVENS CE, TOY PT, TONG MJ, TAYLOR PE, VYAS GN, NAIR PV, GUDAVALLI M, KRUGMAN S. Perinatal hepatitis B virus transmission in the United States. *JAMA* 1985; 253: 1740-1745.
127. KANAİK, TAKEHIRO A, NOTO H, NISHIDAM, TAKAHASHI K, KAWASHIMA Y, IGARASHI Y, MATSUSHITA K, SHMIZU M. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus (HBV) to children of e antigen-positive HBV carrier mothers by hepatitis B immune globulin and HBV vaccine. *J Infect Dis* 1985; 151: 287-290.
128. LELIEPN, REESINK HW, GRIJM R, JONG-VAN MANEN STJV, REERINK-BRONGERSEE. Simultaneous passive and active immunization against Hepatitis B: Non interference of Hepatitis B Immune globulin with the antiHBs response to reduced doses of heat-inactivated Hepatitis B vaccine. *Hepatology* 1986; 6: 971-975.
129. STEVENS CE, TAYLOR PE, TONG MJ, TOY PT, VYAS GN, NAIR PV, WEISSMAN JY, KRUGMAN S. Yeast recombinant hepatitis B vaccine. Efficacy with hepatitis B immune globulin in prevention of perinatal hepatitis B virus transmission. *JAMA* 1987; 257: 2612-2616.
130. ESTEBAN JL, GENESCA J, ESTEBAN R, HERNANDEZ JM, SEJO G, BUTI M, MUÑIZ R, GUARDIA J. Immunoprophylaxis of perinatal transmission of the hepatitis B virus: Efficacy of hepatitis B immune globulin and hepatitis vaccine in a low-prevalence area. *J Med Virol* 1986; 18: 381-391.
131. DIENSTAG JL, STEVENS CE, BHAN AK, SZMUNESS W. Hepatitis B vaccine administered to chronic carriers of hepatitis B surface antigen. *Ann Intern Med* 1982; 96: 575-579.

132. CHIRON JP, COURSAGET P, YVONNET B, AUGER F, LEEQUAN T, BARIN F, DENIS F, DIOPMAR I. Simultaneous administration of hepatitis B vaccine and diphtheria/tetanus/pertussis/polio vaccines. *Lancet* 1984; 1: 623-624.
133. FEINSTONE SM, KAPIKIAN AZ, PURCELL RH, ALTER HJ, HOLLAND PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767-770.
134. KNODELL RG, CONRAD ME, DIENSTAG JL, ELL CJ. Etiological spectrum of post-transfusion hepatitis. *Gastroenterology* 1975; 69: 1278-1285.
135. ALTER HJ, COLEMAN PJ, ALEXANDER WJ, KRAMER E, MILLER JK, MANDEL E, HADLER SC, MARGOLIS HS. Importance of heterosexual activity in the transmission of hepatitis B and Non-A, Non-B hepatitis. *JAMA* 1989; 262: 1201-1205.
136. DIENSTAG JL, ALTER HJ. Non-A, non-B hepatitis: evolving epidemiologic and clinical perspective. *Sem Liv Dis* 1986; 6: 67-82.
137. OKUDA H, OBATA H, MOTOIKE Y, HISAMITSU T. Clinico pathological features of hepatocellular carcinoma. Comparison of hepatitis B seropositive and seronegative patients. *Hepatogastroenterology* 1984; 31: 64-69.
138. DIENSTAG JL. Non-A, non-B hepatitis. II. Experimental transmission, putative virus agents and markers and prevention. *Gastroenterology* 1983; 25: 743-768.
139. BRADLEY DN. The agents of Non-A, non-B viral hepatitis. *J Virol Meth* 1985; 10: 307-319.
140. SUHDJ, WHITE Y, EDDLESTON ALWF, AMINIS, TSIQUAYEK, ZUCKERMAN AJ, WILLIAMS R. Specificity of an immunoprecipitin test for non-A, non-B hepatitis. *Lancet* 1981; 1: 178-180.

141. CHOO QL, KUO G, WEYNER AJ, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-362.
142. KUO G, CHOO QL, ALTER HJ, GITNICK GL, REDEKER G, PURCELL RH, MIYAMURA T, DIENSTAG JL, ALTER MJ, STEVENS CE, TEGTMEIER GE, BONINO F, COLOMBO M, LEE WS, KUO C, BERGER K, SHUSTER JR, OVERBY LR, BRADLEY DW, HOUGHTON M. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human non-A, non-B hepatitis. *Science* 1989; 244: 362-364.
143. ESTEBAN JI, ESTEBAN R, VILADOMIU L, LOPEZ-TALAVERA JC, GONZALEZ A, HERNANDEZ JM, ROGET M, VARGAS V, GENESCA J, BUTIM, GUARDIA J, HOUGHTON M, CHOO QL, KUO G. Hepatitis C virus antibodies among risk groups in Spain. *Lancet* 1989; 2: 294-296.
144. VAN DER POEL CL, REESINK HW, LELIE PN, LEENTVAAR-KUYPERS A, CHOO QL, KUO G, HOUGHTON M. Anti-hepatitis C antibodies and non-A, non-B post-transfusion hepatitis in the Netherlands. *Lancet* 1989; 2: 297-298.
145. KÜHNEL P, SEIDL S, STANGEL W, BEYER J, SIBROWSKI W, FLIK J. Antibody to hepatitis C virus in German blood donors. *Lancet* 1989; 2: 324.
146. ROGGENDORF M, DEINHARDT F, RASSHOFER R, EBERLE J, HOPF U, MÖLLER B, ZACHOVAL R, PAPE G, SCHRAMM W, ROMMEL F. Antibodies to hepatitis C virus. *Lancet* 1989; 2: 324-325.
147. KARMEN A, WROBLEWSKI F, LADUE JS. Transaminase activity in human blood. *J Clin Invest* 1955; 34: 126-134.
148. BERGMAYER HU, HORDER M, MOSS DW. Provisional recommendations on IFCC methods for the measurement of catalytic concentrations of enzymes. *Clin Chem* 1978; 24: 720-721.

149. INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY. Committee on standards. Special Report. *Clin Chem* 1977; 23: 887-889.
150. WROBLEWSKI F, LADUE J. An improved method for the spectrophotometric assay of glutamic oxalacetic transaminase in human blood serum. *Proc Soc Exper Bio Med* 1956; 91: 569-571.
151. INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY. Enzyme panel. *Clin Chem Acta* 1980; 105: 147-149.
152. BURRELL CJ, MACKAY P, GREENAWAY PJ, HOFSCHEIDER PH, MURRAY K. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR 322. *Nature* 1979; 279: 43-47.
153. STAHL S, MACKAY P, MAGAZIN M, BRUCE SA, MURRAY K. Hepatitis B virus core antigen: synthesis in *Escherichia coli* and application in diagnosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 1606-1610.
154. WOLTERS G, KUIJPERS L, SCHUURS A. Detection of human antibodies to hepatitis B surface antigen (HBsAg) by an enzyme-immunoassay for HBsAg. *J Clin Pathol* 1979; 32: 1264-1271.
155. ZANETTI AR, BEDARIDA G, FERRONI P, D'AGOSTINO F, BIANCHI V. Status and significance of testing for hepatitis B surface antigen and surface antibody. *J Virol Meth* 1980; 2: 71-83.
156. MARION PL, OSHIRO LS, REGNER DC, SCULLARD GH, ROBINSON WS. A virus in beecheyground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 2941-2945.
157. GONZALEZ R, SERRA MA, RODRIGO JM, DEL OLMO JA, APARISI L, BIXQUERT M, NOGUEIRA JM. Difusion intrafamiliar del virus de la hepatitis B (VHB). *Rev clin Esp* 1988; 182: 127-133.

158. GENESCA J, ESTEBAN JI, ESTEBAN R, BUTI M, MUÑIZ R, SEIJO G, HERNANDEZ JM, GUARDIA J. Difusión intrafamiliar del virus de la hepatitis B. Estudio de contactos familiares de portadores crónicos. *Med Clin (Barc)* 1986; 87: 271-274.
159. ACERO D, PROFITOS J, MARTI MJ, PALOMER J, MARRUGAT J, BRUGUERA M. Prevalencia del HBsAg en donantes voluntarios de sangre de las comarcas de Girona. Estudio prospectivo y distribución geográfica. *Gastroenterología y Hepatología* 1985; 8: 26-35.
160. VARGAS V, PEDREIRA JD, ESTEBAN R, HERNANDEZ JM, PIQUERAS J, GUARDIA J. Marcadores serológicos del virus de la hepatitis B en población sana. *Med Clin (Barc)* 1982; 78: 265-267.
161. WRIGHT RA. Hepatitis B and the HBsAg carrier. An outbreak related to sexual contact. *JAMA* 1975; 232: 717-721.
162. ALTER MJ, AHTONE J, WEISFUSE I, STARKO K, VACALIS TD, MAYNARD JE. Hepatitis B virus transmission between heterosexuals. *JAMA* 1986; 256: 1307-1310.
163. HEUN E, WHITWORTH B, VOGT R, LICHTENSTEIN M, BUCKLEY B. Hepatitis B virus transmission between heterosexuals. *JAMA* 1987; 257: 314.
164. TASSOPOULOS NC, PAPAEVANGELOU GJ, ROUMELIOTOU-KARAYANNIS A, TICEHURST JR, FEINSTONE SM, PURCELL SM. Detection of hepatitis B virus DNA in asymptomatic hepatitis B surface antigen carriers relation to sexual transmission. *Am J Epidemiol* 1987; 126: 587-591.
165. RAMALHO F, VELOSA J, CARNEIRO DE MOURA M. Riesgo de infección por contactos familiares con portadores crónicos y asintomáticos de HBsAg. *Gastroenterología y Hepatología* 1986; 9: 36-40.
166. SZMUNESS W, PRINCE AM, HIRSCH RL, BROTMAN B. Familial clustering of hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1973; 270:1162-1166.

167. BERNIER RH, SAMPLINER R, GERETY R, TABOR E, HAMILTON R, NATHANSON N. Hepatitis B infection in household of chronic carriers of hepatitis B surface antigen. Factors associated with prevalence of infection. *Am J Epidemiol* 1982; 116: 199-211.
168. BRUGUERA M, CABALLERIA J, ACERO D, BOSCH J, RODES J. Transmisión intrafamiliar del virus de la hepatitis B. *Gastroenterol Hepatol* 1980; 3: 13-18.
169. LONDON WT, BLUMBERG BS. A cellular model of the role of hepatitis B virus in the pathogenesis of primary hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1982; 2: 10S-13S.
170. SZMUNESS W, HARLEY EJ, PRINCE AM. Intrafamilial spread of asymptomatic hepatitis B. *Am J Med Sci* 1975; 270: 293-304.
171. GUNBY P. California battles perinatal hepatitis B. *JAMA* 1982; 247: 1238.
172. WETZEL AM, KIRZDS. Routine hepatitis screening in adolescent pregnancies: Is it cost effective?. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 156: 166-169.
173. BAKER DA, BIENSTOCK J, METZ G, ROCHELSON BL, MONHEIT AG. Serologic screening of pregnant women at high risk for transmitting hepatitis B to their newborn. *Bull NY Acad Med* 1986; 62: 282-286.
174. GONZALEZL, SALVA F, ALOMAR P, PARRASF, DEL VALLE JM, SERRA C. Estudio prospectivo de transmisión vertical del VHB en gestantes: Incidencia y efectos de la profilaxis. Congreso Nacional de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Granada. 1988.
175. CASTILLO G, SALMERON J, MAROTO C, BERNAL C, GONZALEZ F, LOSCERTALES M, LOPEZ F, RUIZ A. Profilaxis de la transmisión vertical del virus de la hepatitis B: XVII Congreso Español de Pediatría. Zaragoza. 1988.
176. McMAHON BJ, RHOADES ER, HEYWARD WL, TOWER E, RITTER D, LANIER AP, WAINWRIGHT RB, HELMINIAK C. A comprehensive

programme to reduce the incidence of hepatitis B virus infection and its sequelae in Alaskan natives. *Lancet* 1987; 2: 1134-1136.

177. LOK ASF, LAI CL, WU PC. Prevalence of isolated antibody to hepatitis B core antigen in an area endemic for hepatitis B virus infection: Implications in hepatitis B vaccination programs. *Hepatology* 1988; 8: 766-770.
178. HADLER SC, MURPHY BL, SCHABLE CA. Epidemiological analysis of the significance of low-positive test results for antibody to hepatitis B surface and core antigens. *J Clin Microbiol* 1984; 19: 521-525.
179. TEDDERS RS, CAMERON CH, WILSON-CROOM R. Contrasting patterns and frequency of antibodies to the surface core and e antigens of hepatitis B virus in blood donors and homosexual patients. *J Med Virol* 1980; 6: 323-332.
180. RULLS, MEDARDE A, PANIZO A. La transmisión vertical de la hepatitis B. *Rev Esp Enf Ap Digest* 1984; 66: 345-348.
181. DOMINGUEZ FM, FERNANDEZ JJ, TARILONTE MA, GUERRERO F, MORENO F. Prevención de la hepatitis B en hijos de madres portadoras de HBsAg positivo. *Medicina Integral* 1988; 11:29-32.
182. DESCOS B, LACHAUX A, HERMIER M. Prevention des infections perinatales aux virus des hepatitis A, B et non A- non B. *Pediatrie* 1987; 42: 3-5.
183. SUMMERS PR, BISWAS MK, PASTOREK JG, PERNOLL ML, SMITH LG, BEAN BE. The pregnant hepatitis B carrier: Evidence favoring comprehensive antepartum screening. *Obstet Gynecol* 1987; 69: 701-704.
184. KUMAR ML, DAWSON NV, McCULLOUGH AJ, RADIVOYEVITCH M, KING KC, HERTZ R, KIEFER H, HAMPSON M, CASSIDY R, TAVILL AS. Should all pregnant women be screened for hepatitis B?. *Ann Intern Med* 1987; 107: 273-277.

185. McQUILLAN GM. Prevention of perinatal transmission of hepatitis B virus. *Am J Epidemiol* 1987; 126: 484-491.
186. STEVENS CE. Perinatal hepatitis B virus infection: screening of pregnant women and protection of the infant. *Ann Intern Med* 1987; 107: 412-413.
187. DRAGOSICS B, FERENCI P, HITCHMAN E, DENK H. Long-term follow-up study of asymptomatic HBsAg-positive voluntary blood donors in Austria: A clinical and histologic evaluation of 242 cases. *Hepatology* 1987; 7: 302-305.
188. LOHIYA G, LOHIYA S, NGO VT, CRINELLA R. Epidemiology of hepatitis B e antigen and antibody in mentally retarded HBsAg carriers. *Hepatology* 1986; 6: 163-166.
189. SZMUNESS W, NEURATH AR, STEVENS CE, STRICK N, HARLEY EJ. Prevalence of hepatitis B "e" antigen and its antibody in various HBsAg carriers populations. *Am J Epidemiol* 1981; 113: 113-121.
190. ARICO S, ARAGONA M, RIZZETTO M, CAREDDA F, ZANETTI A, MARINUCCIG, DIANAS, FARCIP, ARNONE M, CAPORASO N, ASCIONE A, DENTICO P, PASTORE G, RAIMONDO G, CRAXIA. Clinical significance of antibody to the hepatitis Delta virus in symptomless HBsAg carriers. *Lancet* 1985; 1: 356-358.
191. SMEDILE A, DENTICO P, ZANETTI A, SAGNELLI E, NORDENFELT E, ACTIS GC, RIZZETTO M. Infection with the Delta Agent in chronic HBsAg carriers. *Gastroenterology* 1981; 81: 992-997.
192. GENESCA J, SARDIR, PRATS, BUTIM, ESTEBAN R, HERNANDEZ JM, VIVANCOS JL, PUIGDOMENECH P, GUARDIA J. Valor de la determinación sérica del DNA del virus de la hepatitis B como marcador de replicación vírica. *Med Clin (Barc)* 1986; 87: 665-668.
193. NEGRO F, CHIABERGE E, OLIVIERO S, HAMMER M, BERNINGER M, CANESE MG, BONINO F. Hepatitis B virus DNA (HBV-DNA) in anti-HBe

positive sera. *Liver* 1984; 4: 177-183.

194. SCOTTO J, HADCHOUEL M, HERY C, YVART J, TIOLLAIS P, BRECHOT C. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique: Comparison with results for other viral markers. *Hepatology* 1983; 3: 279-284.
195. CARREÑO V, PORRES JC, MORA I, HERNANDEZ C. Utilidad de la determinación de actividad DNA polimerasa del virus B de la hepatitis (VBH-DNAp) en portadores crónicos de AgHBs. *Rev Clin Esp* 1984; 174: 75-77.
196. ERCILLA MG, BARRERA-SALA JM, GELABERT A, BRUGUERA M, GIL MP, SOLEY F, LACHEN MJ, RODES J, CASTILLO R. Impact of HCV antibodies screening in blood donors in the prediction of Non-A, Non-B post-transfusion hepatitis. First International Symposium Hepatitis C virus. Italy. 1989.
197. ANELONI V, CAVIGLIA G, FRISONI R, GALLO ML, GROSSI A, MENINI C. First International Symposium Hepatitis C virus. Italy. 1989.
198. GUPTA B, AGARWAL S, JOSHI VV. Maternal/fetal transmission of HBsAg negative hepatitis. *Lancet* 1978; 2: 740.
199. PANDA SK, BHAN MK, GUHA DK, GUPTA A, DATTA R, ZUCKERMAN AJ, NAYAK NC. Significance of maternal and infant serum antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B virus infection of infancy. *J Med Virol* 1988; 24: 343-349.
200. STEVENS CE. Hepatitis viral en el embarazo: Importancia del obstetra. *Clin Obstet Gynecol* 1983; 26: 621-628.
201. BOTHA JF, RITCHIE MJ, DUSHEIKO GM, MOUTON HWK, KEW MC. Hepatitis B virus carrier state in black children in Ovamboland: Role of perinatal and horizontal infection. *Lancet* 1984; 1: 1210-1212.

202. HYAMS KC, OSMAN NM, KHALED EM, KORAA AAEW, IMAM IZ, EL-GHORAB NM, DUNN MA, WOODY JN. Maternal-infant transmission of hepatitis B in Egypt. *J Med Virol* 1988; 24: 191-197.
203. CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Postexposure prophylaxis of hepatitis B. Recommendations of the Immunization Practices Advisory Committee. *Ann Intern Med* 1984; 101: 351-354.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes

en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de

*Carmen Dén de Uli*

de *Estudio morfológico hepático entre miembros*  
*de tres generaciones relacionadas con fermentos*  
*H. P. S. S. Pontica*

*maumun sod.*

*Acto cum laude per*

Sevilla, 19 de noviembre 1990

El Vocal,



El Vocal,



El Vocal,



El Secretario,



El Doctorado,

