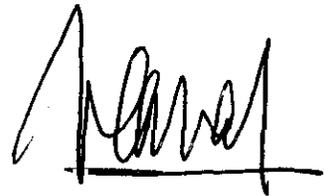


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

Distribución de subtipos de antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B en diferentes poblaciones de portadores y caracterización de variantes antigénicas.



Memoria presentada por el
licenciado D. Juan Emilio Echevarría
Mayo para optar al Grado de Doctor
en Farmacia



Trabajo realizado bajo la dirección del
Dr. D. Julio Casal Lombos

A Charo

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Jose Manuel Echevarría, director del proyecto en el que se encuadra este trabajo, el haberme proporcionado la mayor parte de mis conocimientos de Virología y el haber encauzado este trabajo a través de una labor constante y cotidiana. La grata circunstancia de que además sea mi hermano, me lleva a hacerlo con especial cariño.

También quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Julio Casal, director de esta tesis, sin cuya participación no hubiera podido culminarse.

Agradezco al Instituto de Salud Carlos III la concesión de la beca predoctoral que me hizo posible realizar este trabajo, así como los medios puestos a mi disposición.

Debo agradecer a Pilar León, facultativo responsable de la Unidad de Hepatitis, y a los compañeros, Jose Antonio López y Pilar Balfagón, el haberme enseñado y ayudado en el laboratorio, inculcándome sus minuciosos hábitos de trabajo.

Doy las gracias a Antonio Tenorio por haberme introducido en las técnicas de aislamiento de virus y PCR, así como por sus valiosos consejos y apoyo personal durante la realización del estudio. Hago extensivo este agradecimiento a Ana, Conchita, Domingo, Manolo, Maruja y Paloma, compañeros de la Unidad de Virología.

A Carlos Domingo y a Gerardo Contreras les agradezco su ayuda a la hora de seleccionar las muestras y su orientación en aspectos clínicos.

Este estudio no hubiera podido llevarse a cabo sin las muestras aportadas generosamente por la Dra. Amelia González del Laboratorio de Salud pública del principado de Asturias, Dr. Omeñaca del Hospital Miguel Servet de Zaragoza, Dr. Aguilar del Hospital Carlos Haya de Málaga, Dr. Pérez Lanza del Banco de Sangre de Málaga, Dra. Rabella del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona, Dr. J.L. Martínez del Hospital de Navarra, Dr. A. Medarde y Dra. A. Camarero del Banco de Sangre de Navarra, Dr. Aznar del Centro Regional de Transfusión Sanguínea de Sevilla y Dr. Orduña del Hospital Universitario de Valladolid. Muchas gracias a todos ellos.

Quiero agradecer al Dr. Ignacio Odriozola de BLOKIT S.A., a la Dra. Eloisa Guerrero de ABBOTT España, a los Drs. Decker y Devare de ABBOTT U.S.A, al Dr. Tanaka del Instituto de Inmunología de Tokio y al Dr. Crivelli de SORIN BIOMEDICA el haberme suministrado desinteresadamente muchos de los reactivos inmunológicos.

Agradezco a los Drs. Carman del Instituto de Virología de Glasgow y Magnius del Laboratorio Nacional de Bacteriología de Estocolmo el haber realizado la secuenciación de las muestras, así como a la Dra. Couroucé del Instituto Nacional de Transfusión Sanguínea de París los análisis con antisueros policlonales. A todos ellos les doy las gracias, igualmente, por sus valiosos comentarios sobre algunos aspectos de este trabajo.

A Inma le agradezco su atención y apoyo en las pequeñas decepciones y alegrías cotidianas, tan características del trabajo en el laboratorio.

A Pablo le agradezco la síntesis de los oligonucleótidos, así como a Angel, fotografo del CNMVIS, la realización de fotos y diapositivas.

A Carmen, mi hermana y compañera del Area de Diagnóstico, le agradezco su cariño y su apoyo en los momentos más difíciles de estos años.

La lista de los compañeros del Servicio y del Centro que han contribuido con su presencia a hacer mas agradable el trabajo sería excesivamente larga para reflejarla aquí. *Vaya para todos ellos mi mas sincero agradecimiento.*

Doy las gracias al Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia y, en especial al Dr. D. Miguel Sánchez, ponente de esta tesis, por haberla tutelado.

Quiero expresar mi cariño y reconocimiento a mi Madre, que supo educarme y darme los medios para poder estudiar, sobreponiéndose a circunstancias muy duras y difíciles. Esta tesis es, en gran medida, la culminación de su labor.

A Charo le agradezco su ayuda, su comprensión y su cariño, siempre presentes en todo lo que hago.

ABREVIATURAS EMPLEADAS

Unicamente se consignan en este apartado aquellas que no son de uso común o, aun siendolo, las que pensamos que pueden inducir a error al usarse con frecuencia otras diferentes en su lugar para designar al mismo objeto.

AcM. Anticuerpo monoclonal.

ADVP. Adictos a drogas de administración por vía parenteral.

anti-HBc. Anticuerpos frente al antígeno de nucleocápside del Virus de la Hepatitis B.

anti-HBe. Anticuerpos frente al antígeno "e" del Virus de la Hepatitis B.

anti-HBs. Anticuerpos frnte al antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B.

CPH. Complejo principal de histocompatibilidad.

DHBV. Virus de la Hepatitis B del pato.

EIA. Enzimoinmunoanálisis.

GHBV. *Virus de la Hepatitis B de la ardilla.*

Kb. Kilopares de bases.

KD. Kilodaltons.

HBsAg. Antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B.

HBcAg. Antígeno de nucleocápside del Virus de la Hepatitis B.

HBeAg. Antígeno "e" del Virus de la Hepatitis B.

HBxAg. Antígeno "x" del Virus de la Hepatitis B.

RIA. Radioinmunoanálisis.

TBE. Tampón Tris Borato EDTA.

UI. Unidades Internacionales de anti-HBs.

VHA. Virus de la Hepatitis A.

VHB. Virus de la Hepatitis B.

VHB2. *Virus de la Hepatitis B tipo 2.*

VHC. Virus de la Hepatitis C.

VHD. *Virus de la Hepatitis Delta.*

VHE. Virus de la Hepatitis E.

WHBV. *Virus de la Hepatitis B de la marmota.*

INTRODUCCION

A) HEPATITIS INFECCIOSAS. TIPOS E IMPORTANCIA SANITARIA	1
B) VIRUS DE LA HEPATITIS B. GENERALIDADES	
b.1 Morfología, estructura y clasificación.....	4
b.2 Ciclo de replicación	7
b.3 Respuesta inmune	9
b.4 Patogenia celular	11
b.5 Patogenia de la infección por VHB	12
b.6 Mecanismos de persistencia y patogenia de la hepatitis B crónica	13
b.7 Diagnóstico de la infección por VHB	
b.7.1 Diagnóstico de la infección aguda	15
b.7.2 Diagnóstico de la infección crónica	16
b.7.3 Banco de sangre	17
b.7.4 Estudios prenatales.....	17
b.7.5 Determinación del estado inmunitario	17
b.7.6 Seguimiento de la terapia con interferón	17
b.8 Epidemiología de la Hepatitis B	18
b.9 Tratamiento y profilaxis	19
C) VARIABILIDAD DEL VHB. SUBTIPOS DE HBsAg	
C.1 Definición. Historia	20
C.2 Base molecular de los subtipos de VHB	
C.2.1 Estructura del HBsAg	22
C.2.2 Residuos implicados en los determinantes de subtipo	23
C.3 Métodos de subtipado de HBsAg	
C.3.1 Métodos antigénicos	28
C.3.2 Métodos genómicos	29
C.4 Clasificación genotípica del VHB. Filogenia	29
C.5 Subtipos de VHB como marcadores epidemiológicos	
C.5.1 Distribución geográfica	31
C.5.2 Distribución en distintas poblaciones de riesgo	33
C.6 Implicaciones de los subtipos de VHB en patología	34

D) VARIABILIDAD DEL VHB. VARIANTES ANOMALAS

d.1 Variantes en HBsAg

d.1.1 Coexistencia de determinantes de subtipo mutuamente excluyentes	35
d.1.2 Variantes defectivas en determinantes de subtipo	37
d.1.3 Variantes defectivas en determinante común	37
d.1.4 Hepatitis B en ausencia de HBsAg	40

d.2 Variantes en otros componentes

d.2.1 Variantes en pre-S	40
d.2.2 Variantes en pre-core y core	41
d.2.3 Variantes en X	41

d.3 Virus de la Hepatitis B tipo 2 42

d.4 Importancia sanitaria de las variantes de VHB

d.4.1 Implicaciones en el diagnóstico. Patrones atípicos de marcadores de infección por VHB	43
d.4.2 Evasión a la respuesta inmune	46
d.4.3 Implicaciones patológicas	46

OBJETIVOS 49

MATERIAL Y METODOS

A) PACIENTES Y MUESTRAS

a.1 Panel de referencia de subtipos de VHB	53
a.2 Casos estudiados	53

B) SUBTIPADO DE HBsAg. METODOS ANTIGENICOS

b.1 Reactivos inmunológicos específicos de determinantes de subtipo

b.1.1 Anticuerpos monoclonales	58
b.1.2 Antisueros policlonales	59

b.2 Técnicas

b.2.1 Enzimoimmunoanálisis indirecto	59
b.2.2 Enzimoimmunoanálisis de neutralización	60
b.2.3 Enzimoimmunoanálisis de inhibición	61
b.2.4 Ensayo comercial del Instituto de Inmunología de Tokio	61
b.2.5 Contraimmunolectroforesis	62

C) SUBTIPADO DE HBsAg. PCR	
C.1 Iniciadores de replicación. Fundamento	62
C.2 Extracción de ADN	64
C.3 Amplificación	64
C.4 Detección de las secuencias amplificadas	64
D) SECUENCIACION	64
E) PROTOCOLO DEL ESTUDIO	66

RESULTADOS Y DISCUSION

A) PUESTA A PUNTO Y COMPARACION DE METODOS	
a.1 Métodos antigénicos	
a.1.1 Especificidad	68
a.1.2 Sensibilidad	71
a.2 PCR. Comparación con métodos antigénicos	71
a.3 Rendimiento de los métodos de subtipado	77
B) DISTRIBUCION DE SUBTIPOS ENTRE PORTADORES DE VHB	
b.1 Distribución geográfica	79
b.2 Distribución en diferentes grupos de riesgo	82
b.3 Distribución en comunidades cerradas	85
b.4 Subtipos y marcadores de replicación vírica	87
b.5 Subtipos e infección por VHD	91
C) SUBTIPOS Y VIRUS DE LA HEPATITIS B TIPO 2	94
D) SUBTIPOS ANOMALOS	
d.1 Coexistencia de determinantes de subtipo	
d.1.1 Discriminación de grupos	99
d.1.2 Muestras del subtipo adw4	102
d.1.3 Muestras con coexistencia de determinantes de subtipo	106
d.2 Ausencia de determinantes de subtipo	108

DISCUSION GENERAL	121
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFIA	134

INTRODUCCION

A) HEPATITIS INFECCIOSAS. TIPOS E IMPORTANCIA SANITARIA

La hepatitis es una enfermedad conocida desde muy antiguo. Las descripciones clínicas hechas por Hipócrates (460-375 AC)(1), todavía válidas en sus aspectos básicos, ya apuntaban el carácter transmisible de la enfermedad. Hoy día conocemos la diversidad de su etiología que comprende diversas deficiencias enzimáticas, fármacos y sustancias tóxicas y agentes infecciosos como causa más común. Durante toda la historia han sido descritos diversos brotes acaecidos durante campañas militares, así como otros asociados a transmisión parenteral, como el ocurrido en 1883 en Breme, entre los trabajadores de un astillero que habían sido inmunizados contra la viruela con una vacuna obtenida de linfa humana. Sin embargo, el carácter transmisible de la enfermedad sólo pudo ser establecido con seguridad mediante experimentos de transmisión realizados durante el período comprendido desde la segunda guerra mundial hasta los años 60. Basándose en ellos, Krugman y colaboradores (2) establecieron dos formas diferentes de hepatitis infecciosa: la "Hepatitis infecciosa clásica" ("Ictericia catarral", "Ictericia Epidémica"), de período de incubación corto y asociada a transmisión oral y la "Hepatitis sérica" ("Hepatitis Postransfusional", "Hepatitis Postvacunal"), de período de incubación más largo, transcurrir más lento y asociada a transmisión parenteral. Por entonces ya se suponía que los agentes infecciosos implicados debían ser virus, dado su carácter filtrable. El primero en ser identificado fue el Virus de la Hepatitis B (VHB) (3,4), cuyos descubridores creían haber encontrado un marcador asociado a la leucemia aguda, al que denominaron Antígeno Australia por haber sido encontrado en una muestra procedente de un aborigen australiano; pocos años después se lograba visualizar por microscopía electrónica (5) en casos de "hepatitis sérica". Hoy día es el único miembro conocido de la familia *Hepadnaviridae* con papel en patología humana. Posteriormente se estableció, tanto su capacidad de producir infección crónica, ascendiendo actualmente a unos 300 millones el número estimado de portadores, como su asociación con el carcinoma hepatocelular, revelándose como uno de los agentes víricos de mayor importancia en patología humana. El agente

productor de la "Hepatitis Infecciosa Clásica", Virus de la Hepatitis A (VHA), fue visualizado por primera vez en 1973, en heces de pacientes (6) mediante inmunomicroscopía electrónica. Posteriormente ha sido clasificado dentro de los picornavirus, siendo su nombre sinónimo de Enterovirus 72, pese a que en el último informe del Comité Internacional de Nomenclatura de Virus (7) se ha segregado del género *Enterovirus* para formar el género *Hepatovirus*. La infección por VHA es asintomática en el 90% de los niños, porcentaje que baja al 25-50% en adultos. Al ser un virus de transmisión oral, bien por contacto directo, o a través de agua corriente o alimentos, el porcentaje de población infectada antes de alcanzar la edad adulta suele ser alto, especialmente en países subdesarrollados. La infección por VHA es autolimitada y confiere inmunidad de por vida, residiendo principalmente su importancia sanitaria en su elevada prevalencia y en la posibilidad de producir hepatitis fulminante en un escaso porcentaje de casos.

A finales de los años 70 se describía el Virus de la Hepatitis Delta (VHD) (8), agente siempre asociado al VHB, ya que se trata de un virus defectivo en ciertos componentes necesarios para su replicación que debe aportar el VHB. El VHD es, pues, solamente capaz de infectar, bien cuando se transmite junto con VHB (coinfección), bien cuando alcanza a un individuo infectado por VHB (sobreinfección). La sobreinfección por VHD se traduce en una hepatitis aguda superpuesta al cuadro crónico por VHB, tras la que el paciente queda persistentemente infectado por ambos virus, incrementándose considerablemente el riesgo de evolución hacia cirrosis hepática aun cuando se tratase de un portador asintomático de VHB. La única vía de transmisión conocida para el VHD es la parenteral, razón por la cual, en nuestro medio, se circunscribe fundamentalmente a adictos a drogas por vía parenteral (ADVP). Sin embargo, la alta prevalencia que presenta en poblaciones sin riesgos parenterales conocidos de ciertas áreas de Italia, Sudamérica y Africa, no se justifica sin la existencia de otras vías de transmisión.

Los avances en el diagnóstico de las infecciones producidas por estos agentes pusieron de manifiesto la existencia de casos de hepatitis infecciosa no filiados a ninguno de ellos, que se denominaron como "Hepatitis no A no B", separables en dos tipos clínico-epidemiológicos similares a los existentes antes del

descubrimiento del VHB y VHA. La hepatitis no A no B postransfusional suponía la pesadilla de los bancos de sangre, que sólo disponían de las transaminasas séricas para detectar donaciones potencialmente infecciosas, método que no evitaba la aparición de casos de hepatitis aguda postransfusional, la cual, además, evolucionaba con frecuencia a formas crónicas con deterioro hepático progresivo similares a las producidas por el VHB. En abril de 1989, y antes de haber podido aislar o visualizar el agente responsable, se publicaba la secuencia completa de su genoma (9), ARN monocatenario de polaridad positiva, marcando un hito metodológico en la historia de la Virología. Los conocimientos previos referentes a su tamaño y propiedades físicas, y el estudio de su secuencia, de la que se dedujeron sus componentes protéicos, permitió encuadrarlo en la familia *Flaviviridae*, de la que actualmente se le considera un género aparte (7). Tan solo hace un año de la presentación de la primera imagen de microscopía electrónica de este agente, el Congreso de Hepatitis Infecciosas de Madrid. Hoy día se dispone de ensayos capaces de detectar anticuerpos frente a cada uno de sus componentes, que permiten localizar las hemodonaciones contaminadas, habiéndose reducido de forma dramática los casos de hepatitis postransfusionales. De nuevo son los ADVP el grupo más afectado, aunque la existencia de casos entre personas sin ninguno de estos riesgos sugiere, de nuevo, la posibilidad de vías de transmisión alternativas, sobre cuyo conocimiento se trabaja intensamente. Finalmente, se describió el Virus de la Hepatitis E (10), agente causal de la hepatitis no A no B de transmisión entérica, de la cual se habían descrito brotes epidémicos en Asia Central, Centroamérica y algunas zonas del Centro y Norte de Africa ligados fundamentalmente a aguas contaminadas. Se trata de un virus desnudo de simetría icosaédrica y con ARN de polaridad positiva, aun no clasificado, aunque similar a los calicivirus. Produce un cuadro similar al del VHA, aunque con una mayor frecuencia de hepatitis fulminante, especialmente en gestantes. Es el único de estos agentes cuya presencia no ha sido detectada en nuestro país.

La primoinfección por el Virus de Epstein-Barr, y en menor medida Citomegalovirus y *Toxoplasma gondii*, puede manifestarse como una mononucleosis infecciosa que cursa frecuentemente con elevación de enzimas

hepáticas, aunque muy raramente con ictericia, precisándose de diagnóstico diferencial. El Virus Herpes Simplex, el Virus Varicela-Zoster y el propio Citomegalovirus pueden producir cuadros de hepatitis en pacientes inmunodeprimidos. La infección por *Coxiella burnetti*, rickettsia causal de la Fiebre Q, puede afectar al hígado cursando con síntomas de hepatitis aguda, e incluso producir un cuadro crónico (hepatitis crónica granulomatosa).

Finalmente, no debemos olvidar los virus productores de fiebres hemorrágicas, especialmente el Virus de la Fiebre Amarilla cuyo hepatotropismo es muy manifiesto y esencial en la patogenia de las hemorragias generalizadas, producidas, en gran medida, por la deficiencia en factores de coagulación que sigue a la destrucción masiva de células hepáticas. Este virus afecta anualmente a millones de personas en Africa y Sudamérica constituyendo uno de los problemas sanitarios más serios en el mundo tropical.

B) VIRUS DE LA HEPATITIS B. GENERALIDADES

No es el objeto de esta Tesis realizar un trabajo bibliográfico exhaustivo sobre aspectos generales del Virus de la Hepatitis B. Me remito, pues, en este apartado a las excelentes revisiones publicadas en la prensa científica, algunas de las cuales se recogen en el capítulo de bibliografía (11,12,13,14,15, 16,17).

b.1 Morfología y estructura. Clasificación.

Según el quinto informe del Comité Internacional para la Nomenclatura de Virus (7), el VHB constituye la especie tipo de la familia *Hepadnaviridae* (Hepadnaviridae), género *Orthohepadnavirus*. Comparte este género con el Virus de la Hepatitis B de la ardilla (GSHBV) y con el Virus de la Hepatitis de la Marmota (WHBV), y la familia con el Virus de la Hepatitis del pato (DHBV) y el Virus de la Hepatitis B del hurón (HHBV), ambos integrados en el género *Avihepadnavirus*.

Se trata de un virus con ADN bicatenario de 3.2 kilobases de longitud, siendo la hebra de polaridad positiva de tamaño variable ya que la encapsidación

se produce antes de ser totalmente elongada. El genoma se encuentra dentro de una nucleocápside de 27 nm de diámetro y simetría icosaédrica formada por 180 capsómeros compuestos por una sola proteína (p22 o proteína del "core") con propiedades antigénicas (antígeno de nucleocápside, HBcAg), y que interacciona con el genoma a través de regiones cargadas positivamente homólogas a las de las histonas (figura 1). Rodeando a la nucleocápside, que también contiene una ADN polimerasa ARN-ADN dependiente, se encuentra una envuelta de naturaleza proteolipídica donde se hallan insertadas las proteínas de superficie codificadas por el virus: proteína S (P24/GP27), que es la mayoritaria y constituye el antígeno de superficie (HBsAg); proteína M o mediana (GP33/GP36) y proteína L o grande (P39/GP42). Las tres comparten la mayor parte de su secuencia, de tal manera que la proteína M posee toda la de S más otros 55 aminoácidos N terminales, conteniendo L, a su vez, toda la de M más otros 108-119 aminoácidos en su extremo N-terminal. La composición lipídica de la envuelta es similar a la de la célula huésped, siendo sus componentes principales la fosfatidilcolina (60%), colesterol (15%) y triglicéridos (3%).

Las partículas víricas completas (partículas de Dane), de 42 nm de diámetro, se encuentran en *minoría* con respecto a una *proporción mayoritaria* de partículas esféricas de 22 nm de diámetro (HBsAg), y en menor medida de filamentos del mismo grosor, consistentes en envueltas proteolipídicas vacías, siendo esta característica una de las principales peculiaridades de los hepadnavirus. La presencia de proteína L es mucho menor en las partículas de 22 nm que en los filamentos y viriones completos (figura 1).

El ADN viral posee cuatro fragmentos abiertos de lectura (figura 2). La región de la nucleocápside tiene dos codones de iniciación, de tal manera que codifica, bien para la proteína de nucleocápside (HBcAg), bien para una proteína de fusión de ésta con el producto del fragmento pre-core (HBeAg) del que viene precedido. La región de envuelta tiene tres codones de iniciación de tal manera que puede rendir transcritos correspondientes a tres proteínas distintas. El fragmento S codifica para la proteína mayoritaria (HBsAg), pre-s2 lo hace para la secuencia N-terminal exclusiva de la proteína M, y pre-s1 para la de la proteína L. La región X codifica para un polipéptido no estructural con función transactivadora. La región

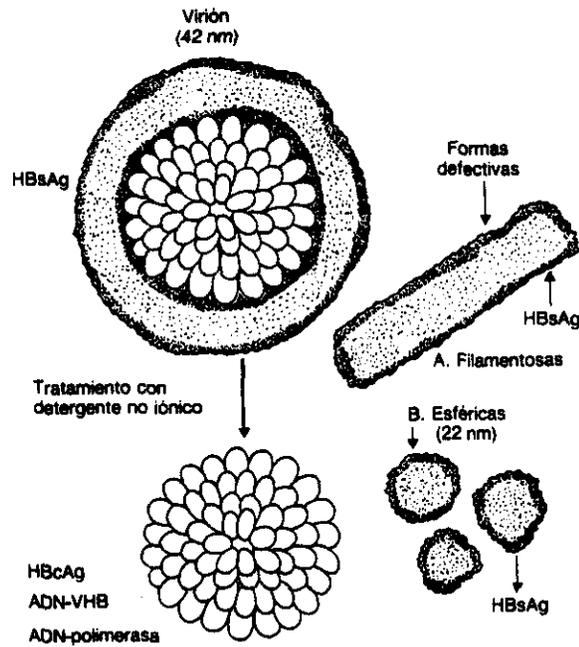
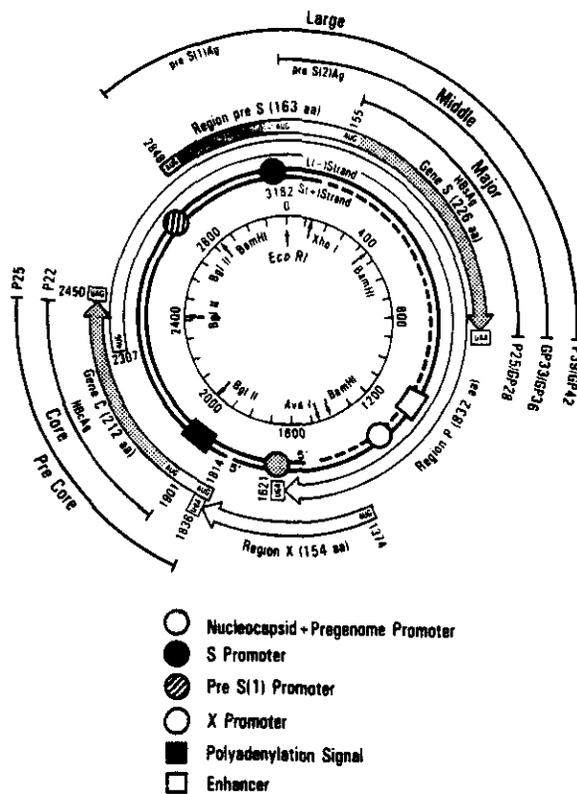


Figura 1 : Estructura del VHB.



de polimerasa solapa con todas ellas siendo leída en otra fase, de tal manera que su producto, la polimerasa vírica, no comparte secuencias con ninguno de los otros componentes. Entre la región X y la de envuelta, se encuentra una región de regulación positiva que aumenta la actividad de transcripción, favoreciendo la replicación del virus. Se conocen cuatro promotores que regulan la expresión de cada una de las regiones. El promotor C, precede a la región de la nucleocápside, e induce la formación de un transcrito de 3.5 Kpb que sirve como pregenoma durante la replicación (ver más adelante), además de codificar para los productos de nucleocápside y la polimerasa vírica. El promotor S se encuentra entre pre-s1 y pre-s2, induciendo ARNm correspondientes a la proteína mayoritaria o a la proteína mediana, según el codon de iniciación utilizado. El promotor pre-s1 precede a dicha región e induce un transcrito codificante para la proteína grande. El promotor X es muy poco activo e induce transcritos de la región X. En el extremo 5' terminal de la cadena positiva se encuentra un oligoribonucleótido, así como una proteína en el de la cadena negativa.

b.2 Ciclo de replicación

El VHB se fija a la célula a través de la interacción entre la proteína L y un receptor celular de naturaleza desconocida. Las partículas de 22 nm apenas contienen proteína L, por lo que no interfieren con los mecanismos de entrada. Una vez adsorbidos, los viriones entran en el citoplasma y se desencapsidan por mecanismos desconocidos, alcanzando el ADN viral el núcleo donde es completada la cadena positiva, liberados sus extremos 5' y circularizado. Una vez hecho esto, es transcrito por la ARN polimerasa II celular en las distintas especies de ARN, de longitud genómica o subgenómica, que abandonan el núcleo para ser traducidos en sus respectivos productos. Parte de los ARN de 3.5 Kb no son traducidos, sino que a la vez que son encapsidados, actúan como pregenoma sirviendo de molde a la polimerasa vírica que los retrotranscribe para dar la hebra de ADN negativa que conservará en su extremo 5' la proteína usada como cebador. Posteriormente, la misma enzima vírica cataliza la degradación del pregenoma, conservando en su extremo 3' un pequeño fragmento metilado que le sirve de iniciador para la síntesis de la cadena positiva. Todo este proceso se produce simultáneamente a la

morfogénesis del virión y a su liberación a torrente sanguíneo, razón por la cual los viriones circulantes presentan la cadena positiva incompleta. El ritmo del proceso de replicación puede ser incrementado por factores celulares desconocidos a través de su unión al potenciador. El ADN viral puede integrarse en el ADN celular, aunque esto no parece necesario para la consecución del ciclo de replicación. Sólo suelen encontrarse integrados fragmentos subgenómicos, sin que exista una pauta fija de unión, habiéndose visto en localizaciones muy distintas del genoma celular.

Las proteínas de nucleocápside tienen destinos diferentes según contengan o no secuencias derivadas de la región pre-core. La proteína p21 (HBcAg) queda en su mayoría en el citoplasma uniéndose a los pregenomas a través de su extremo carboxilo terminal, iniciándose la morfogénesis del virión. El producto de fusión core/pre-core (p25) posee una secuencia señal en su extremo N terminal, que provoca su anclaje a la pared del retículo endoplásmico, donde es escindido por una proteasa celular liberando un péptido de 19 aminoácidos. Un fragmento de longitud variable del extremo C-terminal es también eliminado, quedando finalmente una proteína de 15 a 18 KD que constituye el antígeno e (HBeAg), y que es mayoritariamente secretada al torrente sanguíneo o anclada en la membrana citoplasmática.

Las proteínas de envuelta se insertan en la pared del retículo endoplásmico, siendo internalizadas como partículas de 22 nm. Una vez allí, sufren glicosilación, para ser posteriormente liberadas en el interior de vesículas de Golgi y secretadas al exterior de la célula. La presencia de proteína L, que es la más hidrofóbica al ser la única miristilada, favorecería la retención de las envueltas en el interior celular aumentando las posibilidades de interacción con las nucleocápsides y favoreciendo la morfogénesis del virión completo. Al mismo tiempo se produce la acumulación de filamentos proteolipídicos ricos en esta proteína en el interior del retículo endoplásmico contribuyendo a la desorganización estructural de la célula. La salida de los viriones parece verificarse por un patrón secretorio, similar al de las envueltas vacías, que resulta poco lesivo para la célula huésped y contribuye a la persistencia de la infección.

b.3 Respuesta inmune

La presencia de HBsAg es detectable en suero aun antes del desarrollo de los síntomas de la enfermedad (figura 3). Algo después se comienza a detectar HBeAg. Los primeros anticuerpos detectables van dirigidos contra el HBcAg (anti-HBc), siendo detectados junto al HBsAg desde los primeros momentos de la enfermedad. Los anticuerpos de clase IgM preceden a los de clase IgG. Posteriormente se produce una caída de HBeAg, al tiempo que se detecta respuesta de anticuerpos anti-HBe. Finalmente se produce el aclaramiento del HBsAg y la aparición de sus anticuerpos (anti-HBs), considerándose en este momento superada la infección. Como luego veremos, algunos individuos son incapaces de responder con anti-HBs y aclarar el HBsAg permaneciendo persistentemente infectados. Tanto el HBsAg como los determinantes antigénicos codificados por las regiones pre-S, son T dependientes, precisándose del concurso de linfocitos T auxiliares para dirigir la respuesta humoral específica. Los linfocitos T auxiliares se activan tras reconocer determinantes víricos asociados con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de clase II en la superficie de células presentadoras. Una vez activados realizan las funciones de ayuda a la respuesta humoral a través de mediadores que actúan sobre las células B. Los individuos que presentan deficiencias en la respuesta a estos antígenos podrían tener moléculas del CPH inadecuadas para su presentación. El HBcAg, sin embargo, es T dependiente-independiente, pudiendo inducir respuesta humoral por estimulación directa de linfocitos B específicos, no siendo indispensable la presencia de linfocitos T auxiliares activados. El fenotipo del paciente no influye, pues, en la respuesta humoral frente a este antígeno, por lo que ésta es detectada en individuos persistentemente infectados.

Así como los anticuerpos neutralizantes van dirigidos fundamentalmente frente a proteínas de envuelta, los objetivos de la respuesta citotóxica parecen ser el HBeAg y el HBcAg presentes en la superficie de las células infectadas, en combinación con moléculas del CPH de clase I. Tal como ocurre en la mayoría de las infecciones víricas, la inmunidad celular parece jugar un papel más importante que la humoral en la eliminación de la infección, ya que los anticuerpos circulantes

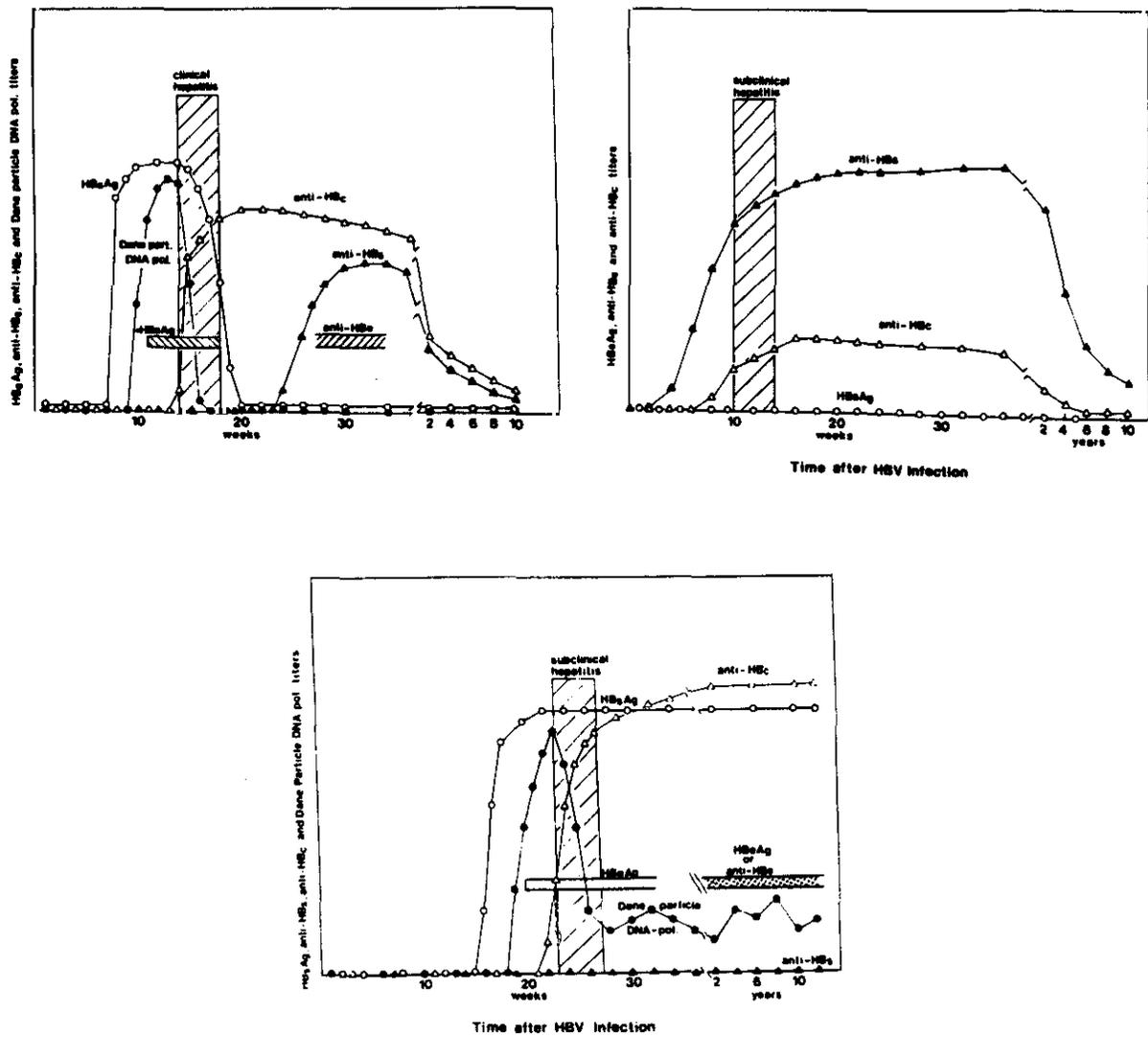


Figura 3: evolución de los marcadores serológicos de infección por VHB.
 a: hepatitis aguda autolimitada.
 b: infección autolimitada subclínica.
 c: infección persistente.

no alcanzan el interior de las células infectadas.

b.4 Patogenia celular

La primera condición necesaria para que se produzca daño celular es que se verifique la infección. El único huésped natural es el hombre, siendo sólo transmisible experimentalmente a chimpancés y gibones, que constituyen el único modelo animal. A pesar del marcado hepatotropismo de los hepadnavirus, el VHB es capaz de infectar otras muchas células, habiendo sido detectado en leucocitos, páncreas, bazo, médula ósea, etc. Sin embargo, hasta el momento no ha podido ser cultivado "in vitro", disponiéndose únicamente de líneas celulares infectadas derivadas de carcinoma hepático. El desconocimiento de la naturaleza del receptor celular reconocido por el virus durante el proceso de adsorción, ha impedido, en gran medida, establecer las bases moleculares de su hepatotropismo, que también podría residir en otros factores celulares capaces de actuar sobre las regiones reguladoras del genoma viral.

Únicamente la asociación del daño hepático con la producción de HBcAg y HBeAg, y la observación de inclusiones de partículas filamentosas en retículo endoplásmico apuntan hacia un daño celular inducido directamente por el virus. La respuesta inmune celular parece ser la principal responsable de la destrucción de los hepatocitos, tal como lo avala la presencia de células CD4+ y CD8+ en los infiltrados de zonas de necrosis, así como la existencia de casos de infección congénita con inmunotolerancia a los antígenos virales que cursan sin síntomas hepáticos, aun existiendo replicación activa. La mayor frecuencia de complejos inmunes HBsAg/anti-HBs circulantes en pacientes con síntomas hepáticos respecto de individuos asintomáticos llevó a proponer un mecanismo citopatogénico mediado por complemento, actualmente desechado en favor del daño mediado por respuesta celular. Sin embargo, si parece ser este el mecanismo responsable de algunas manifestaciones extrahepáticas como la periarteritis nodosa o la glomerulonefritis.

b.5 Patogenia de la infección por VHB.

La llegada del VHB a torrente circulatorio es directa cuando es transmitido por vía parenteral. No se conoce el mecanismo cuando la vía de entrada es a través de mucosas como en el caso de transmisión sexual, aunque se supone que, o bien los epitelios tienen cierta permisividad a la replicación, o bien el virus alcanza el torrente sanguíneo a través de macrófagos residentes. Por otra parte, podría producirse una entrada directa a través de microlesiones en la mucosa. Tampoco se conoce el papel de los leucocitos circulantes en la vehiculización de la infección en el seno del torrente sanguíneo, ni de otros órganos como bazo o médula ósea en la amplificación del inóculo inicial. Estas localizaciones extrahepáticas si que parecen responsables de las reinfecciones observadas en pacientes con cirrosis hepática por VHB sometidos a trasplante de hígado. Solo un 20-35% de las infecciones cursan con síntomas de ictericia tras un período de incubación que varía entre 45 y 120 días. De forma excepcional puede producirse una hepatitis fulminante, con un grado de mortalidad superior al 70%. En cualquier caso, la mayoría de las infecciones son autolimitadas y confieren inmunidad a sucesivas reinfecciones durante toda la vida. Sin embargo, un 5-10% de los pacientes no son capaces de eliminar los antígenos virales permaneciendo persistentemente infectados por el virus durante años, e incluso durante toda la vida. Es conveniente destacar que el establecimiento de infección persistente no siempre va precedido de un cuadro de hepatitis aguda, por lo que una parte importante de los portadores crónicos no recuerdan haber pasado la enfermedad, ignorando en muchos casos su condición. La mayoría de los pacientes crónicamente infectados permanecen sin síntomas clínicos, como portadores asintomáticos, aunque algunos pueden presentar niveles ligeramente elevados de enzimas hepáticas. El resto de ellos sufren hepatitis crónica con presencia de marcadores bioquímicos de daño hepático y biopsia alterada, quedando en situación de alto riesgo de progresión a cirrosis hepática, con grave compromiso de la vida del paciente. Los portadores asintomáticos corren riesgo de sufrir recrudescencias de la infección, evolucionando hacia hepatitis crónica, aunque en la mayoría de los casos esto no ocurre. Existe una fuerte asociación epidemiológica entre el carcinoma hepatocelular y la infección persistente por VHB, sufriendo los portadores crónicos

un riesgo cien veces superior de contraerlo que los individuos no infectados. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la oncogenia del carcinoma hepatocelular, contemplando todos ellos la integración del genoma del VHB como *paso fundamental, habiéndose detectado genomas integrados en la proximidad de varios protooncogenes celulares*. El riesgo de desarrollo de carcinoma hepatocelular aumenta según el grado de deterioro hepático, siendo muy elevado en pacientes con cirrosis.

La sobreinfección por el Virus de la Hepatitis Delta (VHD) se manifiesta como un episodio de hepatitis aguda, que conlleva en la mayoría de los casos la persistencia de ambos agentes, incrementándose dramáticamente el riesgo de progresión hacia estadios avanzados de deterioro hepático en pocos años.

Cuando la infección se contrae por transmisión vertical, se produce inmunotolerancia al VHB, quedando persistentemente infectados un 90% de los neonatos. En estas condiciones es frecuente la replicación masiva de virus en ausencia de daño hepático, ya que este es producido por la respuesta inmune celular. Si ésta se produjese con posterioridad, podría desencadenarse un episodio severo de hepatitis por hiperagresión inmune.

La reciente introducción de técnicas de amplificación genómica capaces de detectar la presencia de cantidades mínimas de ADN (18), está provocando la revisión de algunos conceptos básicos en la patogenia de la infección. Se han podido detectar secuencias de ADN viral en pacientes considerados como inmunes, sugiriéndose que el VHB tiene capacidad de establecer infección latente (19,20). Algunos episodios de reactivación clínica con reaparición de HBsAg observados en algunos pacientes en situación de inmunodepresión (21,22), parecen apoyar esta posibilidad.

b.6 Mecanismos de persistencia y patogenia de la Hepatitis B Crónica.

Aunque los mecanismos de persistencia del VHB no han sido aun totalmente esclarecidos, los datos disponibles sugieren que el virus basa su estrategia en dos fenómenos independientes pero estrechamente relacionados: inducción de inmunotolerancia y escape a la respuesta inmune del huésped. La aparición de lesiones inflamatorias (hepatitis crónica) y necrosis hepatocitaria (lesiones pre-

cirróticas y cirrosis hepática) asociadas a la infección persistente van a depender, en último extremo, del éxito o fracaso del primero de ellos. Dado que la transmisión del VHB de persona a persona requiere contacto estrecho e intercambio de fluidos orgánicos infectados, la persistencia es un fenómeno fundamental para el mantenimiento del virus en la población humana, constituyendo una estrategia básica para su supervivencia.

En la actualidad, se piensa que la síntesis y secreción al torrente circulatorio de grandes cantidades de HBeAg constituye un señuelo para el sistema inmune que es básico para la inducción de la tolerancia inmunológica para la infección. En casos de tolerancia extrema por infección intra-útero, los niños crónicamente infectados no responden con anticuerpos frente a ningún antígeno viral, y soportan una alta replicación del virus en sus hepatocitos, en ausencia de inflamación ni daño hepático. Un grado de tolerancia menor vendría representado por los portadores crónicos que presenten HBeAg circulante y responden con anticuerpos anti-HBc. Estos pacientes replican virus abundantemente en sus hepatocitos, muchas veces en total ausencia de daño hepático. En ambos casos, la tolerancia inducida por el HBeAg circulante prevendría, en mayor o menor medida, la destrucción de las células infectadas por linfocitos T citotóxicos sensibilizados frente a HBeAg y HBcAg.

La aparición de anti-HBe marca un hito en la respuesta inmune que conduce con frecuencia a la eliminación de la infección debido a la destrucción de los hepatocitos infectados por células T específicas dependientes de anticuerpos. Alternativamente, esta respuesta podría seleccionar células persistentemente infectadas pero sólo capaces de sintetizar HBsAg y no partículas completas, induciendo así el estado de portador sano, anti-HBe positivo, en ausencia de replicación viral. Por último, esta respuesta inmune puede seleccionar mutantes pre-core defectivos generados espontáneamente en el curso de la infección (ver d.4.2). De esta manera, se introduciría el estado de portador crónico, anti-HBe positivo, en presencia de replicación viral, asociado casi siempre a lesiones hepáticas especialmente resistentes al tratamiento con interferón. Este fenómeno representa, por tanto, un mecanismo de persistencia basado en el escape a la respuesta inmune por variabilidad genética, que operaría cuando la inducción de

inmunotolerancia en el huésped infectado hubiese fracasado.

b.7 Diagnóstico de la infección por VHB.

Actualmente se dispone de una amplia batería de marcadores de infección que permiten diagnosticar la infección por VHB, precisar la situación del paciente, y predecir su posible evolución. Los distintos requerimientos diagnósticos exigen diferentes estrategias de uso de estos marcadores a fin de ajustar los costos del diagnóstico. La importancia sanitaria de las hepatitis infecciosas ha provocado una fuerte demanda, atendida por las compañías de reactivos mediante la producción una gran variedad de equipos comerciales de diagnóstico, algunos de ellos totalmente automatizados, de excelente calidad y de fácil disponibilidad para los distintos centros de la red sanitaria. La diversidad tecnológica es, pues, muy elevada, aunque, en líneas generales, todos ellos se basan en la detección en suero de antígenos y anticuerpos frente a componentes individuales del virus mediante distintas estrategias de diseño de enzimoimmunoanálisis. Las técnicas de detección de ADN viral por hibridación están también adaptándose a grandes pasos a sistemas automatizados de características similares.

El diagnóstico de la infección por VHB es indisociable del resto de los agentes hepatotropos, para muchos de los cuales se dispone igualmente de marcadores específicos adaptados a los mismos sistemas automatizados.

b.7.1 Diagnóstico de la infección aguda

Los marcadores de infección por VHB útiles para este fin son el HBsAg, anti-HBc total e IgM y anti-HBs total. La mera detección anti-HBc total en presencia de HBsAg únicamente indica la presencia actual de infección, mientras que en presencia de anti-HBs significa estado inmune tras una infección superada. La positividad para IgM anti-HBc indicaría que ésta ha sido contraída recientemente y sería, por tanto indicativa de que nos encontramos ante una infección aguda por VHB. Sin embargo, durante el transcurso de la infección crónica se mantiene una respuesta IgM anti-HBc persistente a bajo nivel que puede incrementarse durante episodios de recrudescencia, por lo que las técnicas comerciales de detección de anti-HBc IgM son deliberadamente disminuidas de sensibilidad para detectar de

forma selectiva niveles altos compatibles con infección reciente. En la práctica rinden resultados positivos en casos de infección crónica, por lo que, en presencia de HBsAg, no representa un marcador seguro de infección aguda, especialmente si se trata de una reactividad baja. La posibilidad de que estemos ante un episodio agudo por sobreinfección delta debe ser investigada cuando el paciente presente prácticas de riesgo. También debemos tener presente la posibilidad de que nos hallemos ante un portador asintomático por VHB con infección aguda por otro agente hepatotropo. La desaparición del HBsAg con seroconversión a anti-HBs en el seguimiento confirmaría el diagnóstico de infección aguda indicando su resolución. Por contra, la persistencia del HBsAg después de seis meses se considera indicativo de evolución hacia el estado de portador crónico.

b.7.2 Diagnóstico de la infección crónica

Una vez establecido el diagnóstico de infección crónica por persistencia de HBsAg (y anti-HBc total) durante más de seis meses, debemos investigar el estado de replicación del virus a fin de establecer un pronóstico y seleccionar los pacientes candidatos a tratamiento por interferón. Si persisten los síntomas clínicos o permanecen elevados los niveles séricos de enzimas hepáticas, se debe practicar biopsia a fin de evaluar el grado de deterioro del órgano.

Los marcadores usados tradicionalmente para este fin son el HBeAg, indicativo de replicación activa y generalmente presente en pacientes con síntomas, y sus anticuerpos (anti-HBe), asociados generalmente a baja replicación viral y frecuentes en portadores asintomáticos. La introducción de la detección de ADN viral por hibridación como marcador de replicación activa supuso modificaciones en estos criterios. Si bien la práctica totalidad de los pacientes HBeAg positivos presentan también ADN viral, algunos de los anti-HBe positivos también lo contienen, y deben ser considerados de la misma manera. Las cepas de VHB que infectan a estos pacientes, frecuentemente con niveles elevados de transaminasas séricas, portan mutaciones en la región pre-core que generan codones de terminación prematuros e impiden la expresión de HBeAg, el cual, como se comentó anteriormente, no es imprescindible para la consecución del ciclo de replicación. Estas variantes parecen generarse durante el transcurso de las

infecciones crónicas en pacientes HBeAg positivo, llevando aparejada la seroconversión a anti-HBe.

El significado diagnóstico de la detección de niveles bajos de ADN de VHB por PCR está aún en estudio, tal como apuntábamos en el apartado de patogenia.

b.7.3 Bancos de sangre

Debe ensayarse HBsAg en todas las hemodonaciones con los métodos disponibles de mayor sensibilidad, desechar las positivas, y manejar el caso según los criterios anteriormente expuestos. En la mayoría de los casos se trata de portadores asintomáticos.

b.7.4 Estudios prenatales

La infección perinatal por VHB se produce con mucha frecuencia en hijos de madres portadoras de HBsAg, especialmente si son positivas para HBeAg, teniendo graves consecuencias para el neonato, ya que en la mayoría de los casos se traduce en una infección persistente. Sin embargo, la administración de vacuna junto con inmunoglobulina en el momento del nacimiento previene el contagio con enorme eficacia. Debe, pues, determinarse HBsAg durante el embarazo, a fin de poder localizar los casos y adoptar las medidas oportunas.

b.7.5 Determinación del estado inmunitario

La correcta orientación de las medidas de inmunoprofilaxis activa en poblaciones de riesgo requiere la localización de los individuos susceptibles, y la evaluación del grado de inmunidad adquirido tras la vacunación. La presencia de más de 10 UI/ml de anti-HBs se considera que protege frente a la infección.

b.7.6 Seguimiento de terapia con interferón

El patrón de marcadores de replicación debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar los portadores crónicos a tratar con interferón. El seguimiento de los marcadores de infección, y especialmente de los niveles de ADN circulante resulta de gran utilidad para evaluar la efectividad del tratamiento.

b.8 Epidemiología de la Hepatitis B

Los individuos crónicamente infectados constituyen la fuente de infección principal, así como el reservorio donde persiste el virus en la comunidad.

El fluido corporal más peligroso es la sangre, aunque también se ha podido detectar HBsAg e incluso ADN viral en otros muchos como semen, secreciones vaginales, saliva o lágrimas, pudiendo conservar la infectividad durante más de seis meses a 30-32°C de temperatura.

Una de las principales vías de transmisión es la inoculación percutánea de fluidos contaminados. Antes del desarrollo de técnicas de detección, las hemodonaciones y los derivados sanguíneos constituían la fuente más importante. Al mismo tiempo que la hepatitis B postransfusional resultaba prácticamente erradicada mediante el control de las hemodonaciones, surgía el problema de los adictos a drogas de administración parenteral que resultan infectados al compartir jeringuillas constituyendo hoy día uno de los grupos de riesgo más numeroso. La adquisición de la infección durante el tratamiento de hemodiálisis no ha podido ser del todo controlada. La hepatitis B se considera una enfermedad de transmisión sexual y es especialmente prevalente entre personas con elevada promiscuidad, destacando los varones homosexuales. Otra de las vías más frecuentes en países de elevada prevalencia es la transmisión vertical, a la que ya aludíamos en el apartado anterior. Por último, en el medio familiar o en el seno de instituciones cerradas, donde el contacto es prolongado, se transmite con efectividad por medios aun no bien conocidos. El problema es especialmente grave en pacientes con Síndrome de Down, ya que las tasas de cronificación se elevan hasta un 30% de los infectados. El personal sanitario es otro grupo con prevalencia superior a la de la población normal.

Los países en vías de desarrollo presentan las mayores tasas de prevalencia de HBsAg, destacando Africa y el sudeste asiático, donde oscila entre el 5 y el 20%, presentando gran parte del resto de la población algún marcador de infección pasada. En estas zonas, la transmisión vertical es el principal modo de difusión. En Europa y Norteamérica la prevalencia de HBsAg oscila entre un 0.1-1%, aunque sube ligeramente en los países mediterráneos. En estas áreas predomina la transmisión horizontal, y los casos tienden cada vez más a localizarse en

poblaciones de riesgo, aunque se sigue manteniendo entre la población general ligado fundamentalmente a contagios intrafamiliares.

b.9 Tratamiento y profilaxis

Durante la hepatitis aguda el tratamiento va únicamente encaminado a disminuir la sintomatología. Los pacientes crónicamente infectados con replicación vírica activa y biopsia hepática alterada, sugerente de probable evolución hacia estados de grave deterioro de la función hepática, deben ser sometidos a tratamiento con α -interferón. La resolución de la infección, con seroconversión a anti-HBs, es muy infrecuente, aunque, sin embargo, en un número considerable de los casos se logra que el paciente quede como portador asintomático, deteniendo la *progresión del deterioro hepático*. El establecimiento de nuevas pautas de tratamiento con interferón y la búsqueda de otros agentes terapéuticos son campos de investigación muy activos.

El control de las hemodonaciones y de los productos derivados, el uso de material quirúrgico y jeringuillas desechables, los usos encaminados a prevenir enfermedades de transmisión sexual y cualquier otra que evite el contacto con sangre y fluidos corporales resultan medidas profilácticas muy eficaces. Actualmente se dispone de una vacuna de antígeno recombinante totalmente segura y eficaz en más de un 90% de los casos, que ha desplazado a los antiguos preparados derivados de sangre de pacientes infectados, que ofrecían menores garantías de seguridad. Sólo se viene empleando en poblaciones de riesgo, aunque se está planteando su generalización incorporándolo al calendario de vacunaciones obligatorias. La vacuna y la inmunoglobulina administradas conjuntamente en sitios diferentes, se usan como profilaxis post-exposición y en niños nacidos de mujeres portadoras.

C) VARIABILIDAD DEL VHB. SUBTIPOS DE HBsAg

C.1 Definición, historia

Una vez que se identificó al Antígeno Australia (3,4) como un componente del Virus de la hepatitis B, se prepararon antisueros que permitieran su detección por inmunodifusión en sueros de pacientes infectados, evidenciándose la falta de identidad absoluta entre antígenos procedentes de distintos individuos. La parte común a todas las cepas, se denominó determinante a, y las diferentes b y c (23). Otros autores obtuvieron resultados similares (24), pero fue Le Bouvier (25) quien propuso la existencia de dos determinantes mutuamente excluyentes a los que llamó d e y, que se expresan en el virus junto con el determinante común a, existiendo, por tanto, dos subtipos diferentes: ad y ay. Bancroft y colaboradores, trabajando con muestras de América y Asia, encontraron diferencias antigénicas dentro del subtipo ad según la procedencia, concluyendo que había una pareja adicional de determinantes de subtipo, que denominaron w/r. Los subtipos se definían, pues, como adw, ayw, adr, ayr, aunque este último no fue encontrado en muestras clínicas hasta algún tiempo después. Couroucé y colaboradores describieron subespecificidades que atribuyeron inicialmente al determinante a (a1, a2¹, a2², a3) (26) y posteriormente al determinante w (w1, w2, w3, w4) (27). Pronto fueron descritos otros muchos determinantes como el x (25), t (27), q (28), n, j, k, Af (27), g (29)), de manera que hubo de convocarse en 1975, en París, una reunión con la idea de poner en común antisueros y muestras para ordenar la complejidad que se había generado. De este simposio surgió un panel de referencia para subtipos de HBsAg, otro de antisueros de subtipado y una nomenclatura aún vigente. Se aceptaron ocho subtipos: ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adr. El determinante q no se especificaba, ya que había sido encontrado en todos los subtipos excepto en adw4; sin embargo, posteriormente se encontraron algunas cepas adr que carecían de él, quedando este subtipo dividido en adr_q⁺ y adr_q⁻ (30). En la figura 4 quedan resumidos la lista de subtipos a la que me he ceñido para la realización de este trabajo.

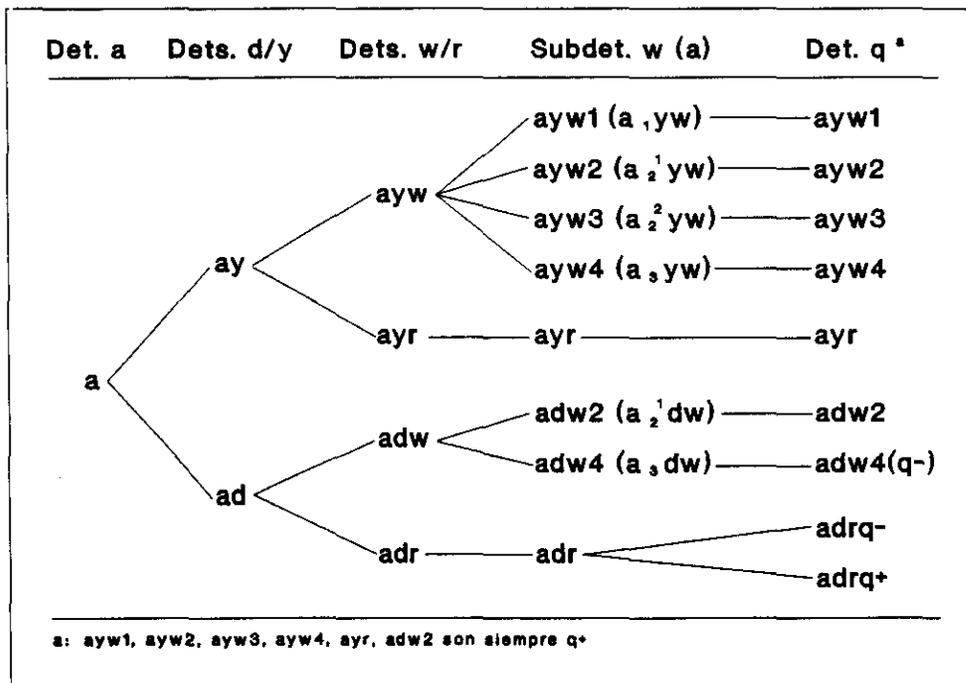


Figura 4.- Determinantes y subtipos de HBsAg. En la presente memoria de tesis se adscribirán las subespecificidades al determinante w. Se indica entre paréntesis la equivalencia al asignarlos al determinante a.

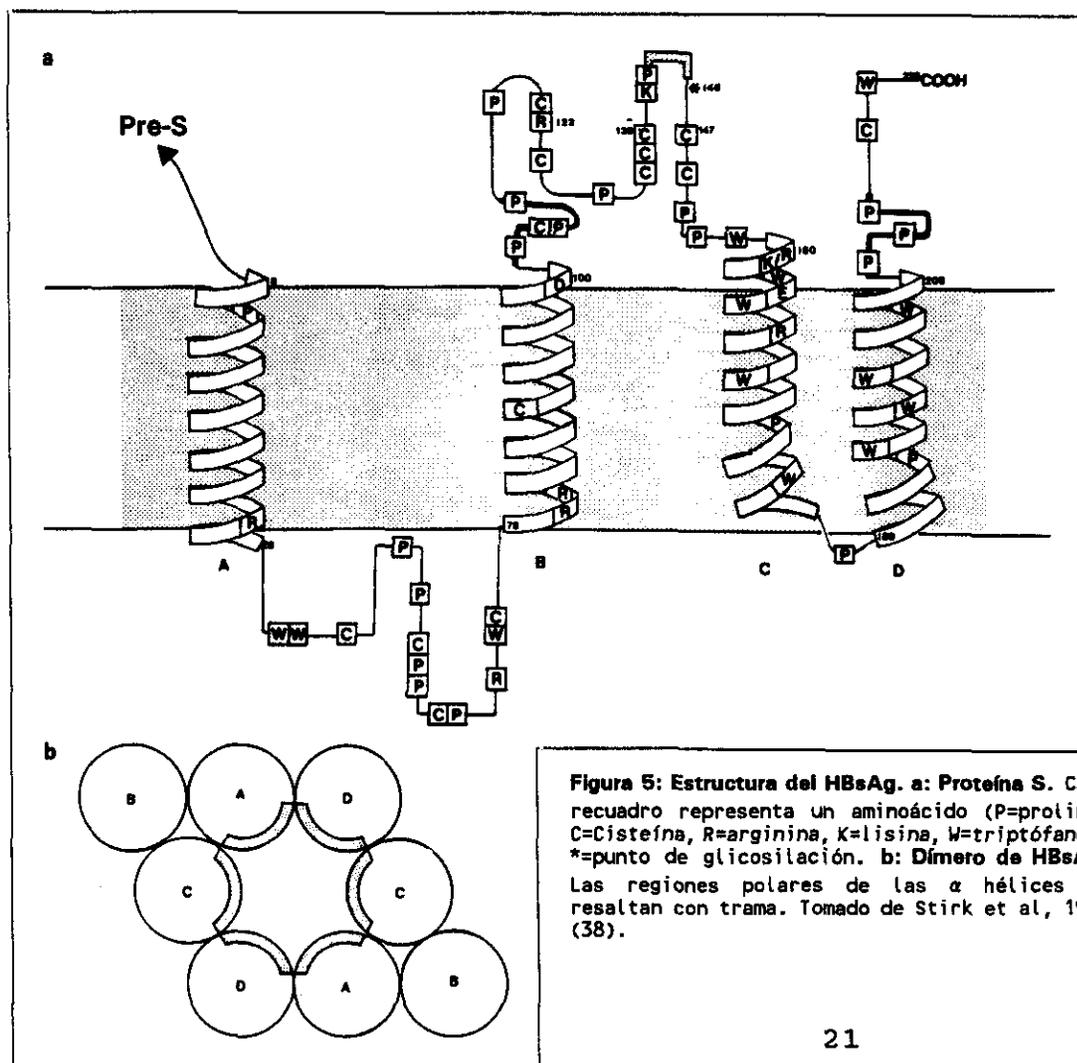


Figura 5: Estructura del HBsAg. a: Proteína S. Cada recuadro representa un aminoácido (P=prolina, C=Cisteína, R=arginina, K=lisina, W=triptófano). * = punto de glicosilación. b: Dímero de HBsAg. Las regiones polares de las α hélices se resaltan con trama. Tomado de Stirk et al, 1992 (38).

C.2 Base molecular de los subtipos de HBsAg

c.2.1 Estructura del HBsAg

El HBsAg se definió únicamente por sus propiedades antigénicas, siendo su ubicación física progresivamente acotada a medida que se acumulaban conocimientos sobre la composición y estructura del VHB. Inicialmente se identificaba con las partículas de 22 nm y posteriormente con las proteínas víricas de envuelta. Hoy día sabemos que reside en la proteína mayoritaria, aunque precisa del entorno característico de la envuelta viral para su correcta expresión. La secuencia de la proteína comprende 226 aminoácidos, oscilando su peso molecular entre 25 y 30 KD según su grado de glicosilación.

La información acumulada durante la última década sobre las secuencias y estructura antigénica del HBsAg, sobre la que nos centraremos en el siguiente apartado, y, en menor medida, sobre aspectos bioquímicos y estructurales básicos (31,32,33,34,35,36,37), ha permitido la elaboración de modelos topológicos. El último de ellos, propuesto por Stirk y colaboradores (38), se muestra en la figura 5. La proteína tendría cuatro segmentos hidrofóbicos trans-membrana con estructura en α -hélice (8-28, 78-100, 160-184, 189-219) quedando dos regiones hidrofílicas expuestas al exterior (100-160, 209-226), aparte de los ocho aminoácidos N terminales que enlazarían con el segmento pre-S2 de las proteínas mediana y grande, que contienen determinantes antigénicos particulares en sus regiones exclusivas e insertan dos α -hélices en la membrana. La región hidrofílica 28-78 queda orientada hacia el interior de la membrana, al igual que la porción 184-189. La asparagina 146 parece ser la única posición glicosilada de las tres posibles. Las hélices A, C, D, son anfipáticas en toda su longitud, presentando un lado polar y otro hidrofóbico, mientras que la hélice B es hidrofóbica en toda su superficie. Las hélices interaccionarían entre sí mediante puentes disulfuro intracatenarios, y con las de otra molécula mediante puentes similares formando un dímero según la figura 5.b. Las hélices anfipáticas dispondrían su parte polar formando un poro hidrofílico, e interaccionando tanto su parte apolar, como la hélice B, con los lípidos de la bicapa. Las partículas de 22 nm están compuestas

por un 75% de proteínas y un 25% de lípidos. El segmento polar interno poseería suficiente longitud para interactuar con las nucleocápsides estabilizando el virión.

Existe un modelo alternativo a éste (36), con sólo dos regiones transmembrana. El conocimiento definitivo de la estructura del HBsAg requeriría estudios de difracción de rayos X similares a los que sustentan modelos estructurales como los de la neuraminidasa (39) y la hemaglutinina (40) del virus de la gripe.

c.2.2 Resíduos implicados en los determinantes de subtipo

Los determinantes de subtipo de HBsAg se definieron mediante el uso de antisueros, por tanto, deben localizarse en porciones de la secuencia expuestas al reconocimiento por el sistema inmune, es decir, en los dominios polares orientados hacia el exterior de la membrana vírica. Los amplios conocimientos actualmente disponibles sobre los residuos que, dentro de estos dominios, influyen en la expresión de determinantes de subtipo, se basan en múltiples aproximaciones metodológicas que conviene repasar antes de descender a los detalles de cada determinante.

Aproximaciones metodológicas.

La amplia información disponible sobre la localización de los diferentes epítomos del HBsAg procede de la aplicación de una metodología muy diversa, que ha permitido ir acotando los residuos implicados en cada uno de los determinantes.

*** Comparación de secuencias.** Desde que a finales de los años 70 se dispuso de la primera (41), el número de secuencias completas del gen de HBsAg publicadas se ha ido incrementando rápidamente, hasta que se pudo comparar la de los cuatro subtipos fundamentales (adw, adr, ayw, ayr) y establecer cuales son los residuos asociados a la presencia de cada determinante (34,42,43,44, 45,46). La caracterización antigénica de las cepas secuenciadas rara vez incluía las subespecificidades, procediendo las muestras casi siempre de los países de origen de los autores (fundamentalmente Norteamérica, Europa y Japón), por lo que era previsible que no incluyeran subtipos como adw4, ayw1 o ayw4, poco frecuentes en dichas áreas geográficas. Recientemente H. Norder y colaboradores

(47,48) han publicado trabajos de comparación de secuencias que incluyen las de todos los subtipos conocidos. Varias posiciones atribuidas anteriormente a determinantes principales (a, d, y, w, r), han sido desechadas al conocerse todos los subtipos.

* **Análisis antigénico de péptidos sintéticos.** La caracterización inmunológica de péptidos sintéticos que representan distintos fragmentos de una proteína permite situar físicamente sus epítopos antigénicos. La búsqueda de péptidos inmunógenos adecuados para el diseño de una vacuna contra VHB ha impulsado considerablemente estos trabajos durante la última década (49,50,51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61). La antigenicidad del péptido puede estudiarse directamente con anticuerpos monoclonales o antisueros, o bien indirectamente obteniendo un antisuero y haciéndolo reaccionar con HBsAg de distintas especificidades. El uso de péptidos solapantes que cubren toda la extensión de la molécula permite estudiar la participación individual de cada residuo aminoacídico (60). También se han empleado para estos fines antígenos recombinantes (62), aunque debido al mayor tamaño de éstos, su grado de discriminación es mucho menor. El uso de péptidos sintéticos sólo permite localizar epítopos lineales, ya que los conformacionales suelen ser discontinuos y afectan a secuencias distantes en la estructura primaria, pero aproximadas en el espacio al plegarse la cadena.

* **Anticuerpos monoclonales.** La especificidad de subtipo de un anticuerpo monoclonal puede conocerse mediante el uso de paneles de referencia. La realización de experimentos de competición entre monoclonales de la misma especificidad de subtipo (61,63,64,65) ha permitido saber si dicho determinante consta de un solo epítipo o de varios. El análisis de HBsAg con paneles compuestos por numerosos anticuerpos monoclonales de distintos grupos de cruce, permite afinar la discriminación antigénica más allá, incluso, de las subespecificidades (64). Los anticuerpos monoclonales se han usado también para la caracterización de péptidos sintéticos en algunos de los trabajos antes citados. Los ensayos con HBsAg nativo o desnaturalizado permiten saber si el determinante reconocido por el AcM es lineal o conformacional (65).

* **Modificación química de residuos.** Los residuos expuestos en la superficie de una proteína, pueden ser modificados químicamente de forma específica, estudiando así su efecto sobre la antigenicidad de la molécula. En el caso del HBsAg, estos estudios arrancan de los años 70, donde se ensayó el efecto de la destrucción de puentes disulfuro, encontrándose epítomos resistentes (lineales) y lábiles (conformacionales) (66). Posteriormente se utilizaron reactivos lo suficientemente específicos como para determinar el efecto de la modificación de residuos individuales sobre los distintos determinantes de subtipo (35,63,67,68).

* **Mutagénesis dirigida.** Ha permitido conocer la importancia antigénica de residuos individuales con mayor exactitud que la modificación química de residuos. Se ha utilizado tanto para obtener mutantes puntuales a partir de cepas de HBsAg antigénicamente normales (68,69,70,71,72), como para revertir mutaciones encontradas en la naturaleza (46), restaurando la expresión antigénica y demostrando el papel del residuo considerado en el determinante alterado.

Determinante común.

Ya desde los primeros momentos de la investigación sobre el HBsAg, se puso de manifiesto que el determinante a consta de múltiples epítomos, tanto lineales como conformacionales. Los numerosos péptidos sintéticos donde se han encontrado epítomos de este determinante abarcan desde las posiciones 110 a 158, siendo varios los grupos de cruce encontrados al trabajar con paneles de anticuerpos monoclonales anti-a. La mayoría de los epítomos parecen depender de la integridad estructural de la proteína, aunque no faltan los monoclonales cuya fijación no se ve alterada por la desnaturalización del antígeno. La comparación de secuencias no aporta nada, ya que se trata de secuencias comunes, aunque la secuenciación de variantes defectivas en algunos de los epítomos está aportando información importante, tal como veremos posteriormente. Al no poder ser seleccionados posibles residuos específicos de a basándose en la comparación de secuencias, se han visto dificultados los experimentos de modificación química y mutagénesis dirigida, disponiéndose únicamente del de Ashton y colaboradores (70), que muestra a las posiciones 124 (Cys), 142 (Pro) y 147 (Cys) como

fundamentales. Estudios posteriores con péptidos solapantes y anticuerpos monoclonales (60) lo corroboran, situando epítomos a lineales entre 117 y 126 y conformacionales entre 124 y 137. La gran mayoría de los anticuerpos inducidos por la infección natural van dirigidos contra el determinante común, razón por la cual hay inmunidad cruzada entre subtipos (73).

Determinantes d/y, w/r.

La comparación de las primeras secuencias publicadas de los cuatro subtipos básicos (adw, ayw, adr, ayr), permitió seleccionar residuos característicos de cada pareja de determinantes. Sin embargo, el rango de variabilidad antigénica no se cubría totalmente, al no tener en cuenta las subespecificidades, de tal manera que sólo recientemente se han podido comparar las secuencias de los nueve subtipos (47, 48). El único residuo exclusivo para d/y es el 122 (Lys/Arg), así como el 160 para w/r (Lys/Arg). Algunas secuencias de subtipos diferentes, como ayw1 y adw2, sólo difieren en una de estas posiciones. Se ha podido inducir el cambio ayr → ayw por mutagénesis dirigida en el aminoácido 160 (69), mientras que el cambio en 122 no fue suficiente, por contra, para producir un cambio de subtipo (68), aunque si lo fue al ser acompañado de variaciones en las posiciones 113 y 134 (71). Por otra parte, se ha encontrado expresado el determinante d en el péptido sintético 138-149 (51), que no incluye la posición 122. Sin embargo, en pacientes doblemente infectados por ad y ay, las secuencias de ambos sólo se diferenciaban en la posición 122, sugiriendo que una había surgido por una mutación puntual en esta posición de la otra cepa (74,75). La modificación química de este residuo (63,68), o su sustitución por un aminoácido distinto de lisina o arginina (46), lleva aparejada la pérdida de la expresión antigénica del determinante.

Aunque estos residuos son imprescindibles para la expresión de un determinante u otro dentro de cada pareja mutuamente excluyente, la expresión del subtipo también depende de otros. Las mutaciones en posiciones conservadas como 124, 142, 144, 145 o 147 (46, 70), muestran que la integridad del determinante a es imprescindible para la expresión del subtipo. Se ha encontrado especificidad de subtipo en varios péptidos sintéticos: 110-137 (55), 122-137 (54), 138-149 (51).

Subespecificidades.

Tan solo disponemos de los recientes datos de comparación de secuencias de la ura C.4 (47,48). El aminoácido 127 resulta clave, siendo siempre prolina en w1 y w2, treonina en w3 y leucina en w4. El subdeterminante w1 sólo ha sido encontrado en combinación con γ , por lo que podría necesitar de la arginina en 122, aunque también pueden apreciarse diversos cambios entre w1 y w2 en los residuos 134, 143, 159, 161 y 168.

Determinante q.

La comparación de las secuencias de subtipos q+ y q- no arroja resultados concluyentes acerca de la ubicación de este determinante (48).

Epítomos reconocidos por la inmunidad celular.

Los linfocitos T se activan al reconocer las proteínas víricas procesadas por las células presentadoras, y expuestas en su superficie junto con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad. Por tanto, las regiones reconocidas no han de estar necesariamente en una porción expuesta del HBsAg, a diferencia de las implicadas en la respuesta humoral. Las aproximaciones metodológicas que implican reactivos serológicos no son de aplicación en este caso. La información proveniente de estudios "in vitro" de respuesta celular a péptidos sintéticos (76), ubica los determinantes de HBsAg reconocidos por la inmunidad celular en el fragmento 4-33, correspondiente, que corresponde a la primera α hélice intramembrana.

Epítomos de la región pre-S.

Las secuencias proteicas codificadas por pre-S parecen ser muy inmunógenas, de tal forma que se ha indicado la conveniencia de su inclusión en futuras vacunas. La secuencia 120-145 (57, 60, 77) parece contener varios determinantes de pre-S2, mientras que los residuos 26-36 (60, 72, 77), 72-78 (72) y 92-107 (77) contienen los de pre-S1. La secuencia 148-174 de pre-S2 es reconocida por la inmunidad celular (58). Mediante anticuerpos monoclonales frente

a estas regiones se han podido distinguir todos los subtipos de VHB, excepto ayw2 de ayw3, mostrando que estas proteínas contienen epítomos de subtipo (59). La respuesta celular a pre-S2 también parece influida por el subtipo (58).

C.3 Métodos de subtipado de HBsAg

C.3.1 Métodos antigénicos

Los subtipos de HBsAg fueron descritos mediante técnicas de inmunodifusión usando antisueros policlonales (23,25) que fueron puestos en común en el simposio de París (27), donde se estableció un panel de referencia de HBsAg que se ha venido empleando hasta la actualidad en la evaluación de reactivos y técnicas de subtipado. El subtipado con antisueros policlonales fue mejorando con la incorporación paulatina de técnicas más sensibles como la contrainmunolectroforesis (78) inhibición de la hemaglutinación (79), radioinmunoanálisis (RIA)(80, 81) y enzimoimmunoanálisis (EIA)(71).

Los anticuerpos monoclonales fueron desplazando a los antisueros policlonales durante los años ochenta, lográndose técnicas de EIA y RIA sencillas y de alta sensibilidad, aunque incapaces de discriminar todas las subespecificidades (63,64,82,83), estando disponible incluso un equipo comercial (HBsAg subtype EIA, Institute of Immunology, Tokyo). Más recientemente, se han descrito baterías de monoclonales casi capaces de distinguir subespecificidades (84). Los determinantes de subtipo fueron definidos mediante antisueros policlonales, por lo que pueden contener diversas especificidades reconocibles por distintos anticuerpos monoclonales. Antes aludíamos a la existencia de diversos grupos de cruce de monoclonales en el determinante a, y, al menos, dos en el determinante y. Distintos anticuerpos monoclonales pueden ser, pues, específicos del mismo determinante de subtipo pero reconocer epítomos diferentes. De hecho, se han descrito, aunque ocasionalmente, resultados discrepantes entre varios anticuerpos monoclonales o entre antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales de la misma especificidad de subtipo (68, 71). Hasta la fecha no se ha realizado una puesta en común de reactivos monoclonales semejante a la que se hizo con antisueros policlonales durante el simposio de París (27).

C.3.2 Métodos genómicos

El conocimiento de las posiciones del genoma vírico características de cada determinante de subtipo ha permitido diseñar métodos selectivos de amplificación genómica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (85,86,87,88). La selectividad se basa, en todos ellos, en el uso de iniciadores específicos para cada determinante de subtipo, que presentan desapareamientos en el extremo 3' al hibridar con secuencias que codifican para determinantes diferentes. Ninguno de ellos es capaz de discriminar los nueve subtipos. La región de proteínas de envuelta del genoma de VHB contiene sitios de corte para algunas enzimas de restricción, que son característicos de cada subtipo y, sin embargo, el análisis de fragmentos de restricción de productos de PCR que contienen estos sitios de corte, ha demostrado una pobre correlación con el subtipado tradicional (89).

El estudio de la secuencia del genoma, sin embargo, sí que permite conocer el subtipo, fijándonos en las posiciones clave a las que aludíamos en apartados anteriores. La variación en otras posiciones permite discriminar cepas más allá del subtipo (90). La correlación con las subespecificidades no está aún suficientemente bien establecida.

C.4 Clasificación genotípica del VHB. Filogenia.

Hemos visto que el salto antigénico de un subtipo a otro puede producirse por una simple mutación puntual, pero que, al mismo tiempo, existen numerosas posiciones dentro del genoma de VHB que varían sin afectar a la expresión de los determinantes antigénicos. Los subtipos de HBsAg, pues, no tienen porqué reflejar la variabilidad genética del VHB. Okamoto y colaboradores (45) clasificaron 18 secuencias de VHB en cuatro grupos (A, B, C, D), de homología que correlacionan solo parcialmente con los cuatro subtipos fundamentales. Así, las cepas adw se dispersan en los grupos A (cepas norteamericanas) y B (cepas orientales), compartiendo el grupo C junto con adr y ayr. El subtipo ayw resulta más homogéneo, quedando encuadradas todas las cepas en el grupo D, independientemente de su procedencia. Al considerar las subespecificidades, incluyendo secuencias de los nueve subtipos, Norder y colaboradores (47) ampliaron la clasificación en dos nuevos grupos (E, F) (figura 6), basándose

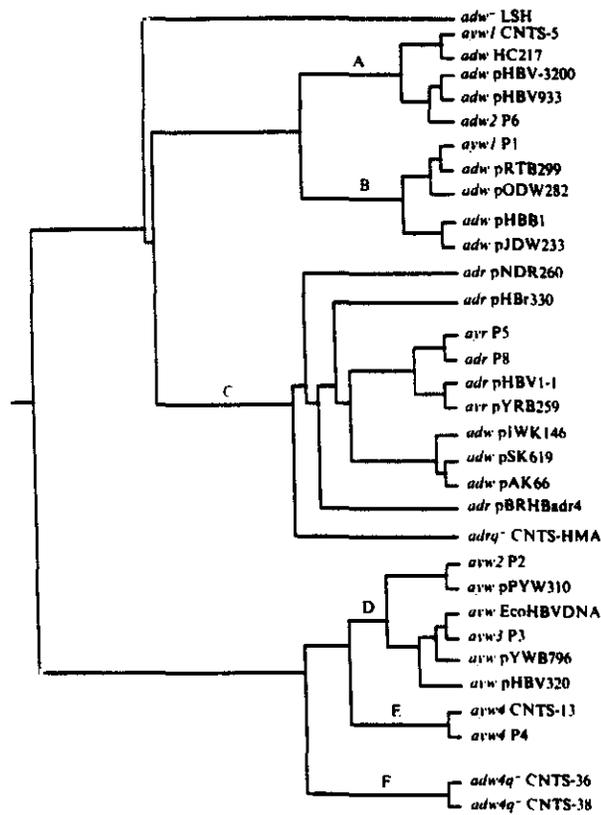


Figura 6: árbol filogenético de los subtipos de HBsAg.
 En letras mayúsculas se indica el grupo genotípico según los criterios de los autores. Tomado de Norder et al., 1992 (47).

únicamente en la secuencia del gen del HBsAg.

Según esta información, se han podido establecer árboles filogenéticos de los distintos grupos de VHB (47), e, incluso, de las distintas especies de hepadnavirus (91). Admitiendo una tasa de mutación de $4.57 \cdot 10^{-5}$ cambios por posición y por año, se estima en 30.000 años el tiempo de divergencia entre el DHBV y los demás hepadnavirus, y en 10.000 entre WHBV/GHBV y VHB, comenzando hace tan solo 3000 años a diverger los distintos grupos de VHB (91).

C.5 Subtipos de HBsAg como marcadores epidemiológicos

C.5.1 Distribución geográfica

Son muchos los trabajos locales sobre distribución de subtipos de VHB, por lo que solo citaremos aquellos más globalizadores (27,92,93). Conviene destacar el de Couroucé y colaboradores (94) por ser el más completo y el único que no se limita a los cuatro subtipos fundamentales, considerando las subespecificidades.

En la figura 7 se recogen los datos de distribución de los cuatro subtipos fundamentales. Como podemos observar, el determinante r es exclusivo de Extremo Oriente y Polinesia, siendo el subtipo ayr muy infrecuente. La distribución de adw4 resulta llamativa, restringiéndose a Polinesia y a Sudamérica, especialmente a Argentina y a ciertos pueblos de la Amazonía. El subtipo adw2 está extendido por la mayor parte del mundo, siendo el prevalente en el norte y centro de Europa, América y el este de Africa. El subtipo ayw1 sólo alcanza prevalencias significativas en el Sureste asiático, teniendo una mínima frecuencia en Africa y América del Sur. Los subtipos ayw2 y ayw3 tienen también una distribución amplia, coexistiendo como subtipos mayoritarios en el Mediterráneo y en Próximo Oriente. El subtipo ayw4 es exclusivo de Africa Occidental, donde, junto con ayw2 es el mayoritario, apareciendo en pequeña proporción en Sudamérica y las Antillas. Esta compleja distribución no sólo responde a la divergencia de la especie por deriva genética, sino que se ve fuertemente influenciada por los movimientos de población acaecidos a lo largo de la historia. Sirvan de ejemplo la presencia de ayw4 en América, a causa del tráfico de esclavos

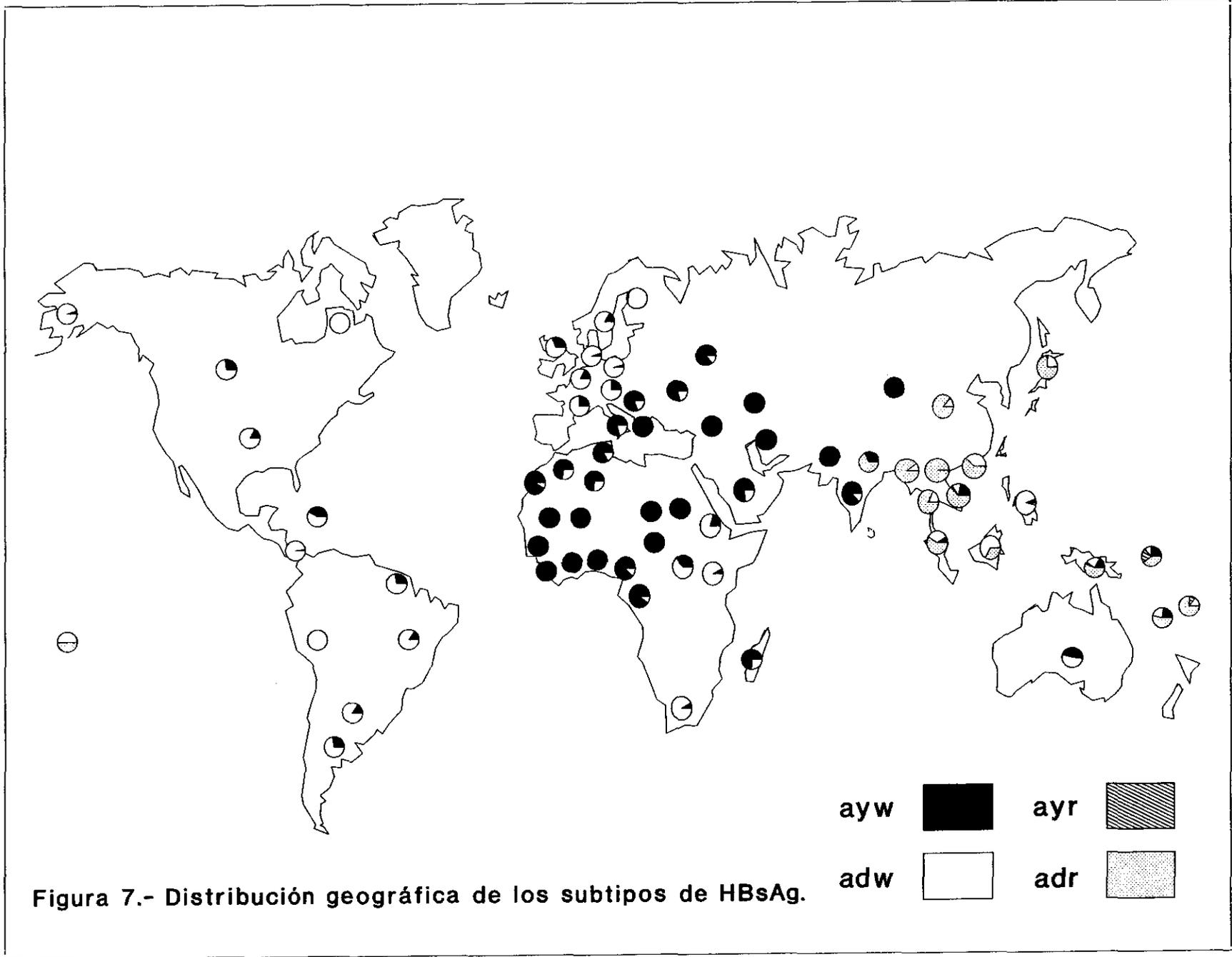


Figura 7.- Distribución geográfica de los subtipos de HBsAg.

africanos, o la presencia residual de subtipos alóctonos en Europa y América, a causa de la fuerte inmigración. Las áreas seleccionadas para este tipo de estudios suelen ser países. Sin embargo, aunque toda la población de un país suele compartir peculiaridades sociales e históricas, los límites políticos resultan artificiales en cuanto a la homogeneidad de la población. De esta manera, se han descrito diversos casos de variaciones en la distribución de subtipos entre regiones distintas de un mismo país (95,96,97), especialmente si alberga diversas etnias (98).

C.5.2 Distribución en distintas poblaciones de riesgo

En una determinada área geográfica coexisten poblaciones que, en base a sus distintas formas de vida, pueden mantener escaso contacto, favoreciéndose una particular circulación del virus para cada una de ellas. En nuestro caso, este fenómeno se traduciría en una distribución de subtipos diferente para cada población. Así, las comunidades de inmigrantes conservan los subtipos propios de sus países de origen, difiriendo de la distribución en la población general autóctona del área de estudio (84,94,99,100). Los adictos a drogas de administración parenteral se comportan como una población aislada, caracterizada, en zonas donde el subtipo adw es mayoritario como Europa y América del Norte, por una elevada prevalencia del subtipo ayw (101,102,103,104,105, 106), más concretamente ayw3, (94). Sin embargo, otros grupos de riesgo, como varones homosexuales o prostitutas, no presentan una distribución diferente a la de la población general (84).

La distribución de subtipos refleja de forma clara el aislamiento de ciertas comunidades cerradas, como las cárceles, donde el intercambio de virus con la comunidad es muy pequeño (84).

Los subtipos de VHB han sido también empleados para estudios de transmisión intrafamiliar (27,107,108,109), encontrándose, en la mayoría de los casos, todos los miembros infectados por el mismo subtipo. Así mismo, han resultado de gran utilidad para el estudio de brotes de hepatitis B, como los producidos en unidades de hemodiálisis (107), permitiendo dilucidar si la fuente de infección fue única o múltiple.

C.6 Implicaciones de los subtipos de VHB en patología.

Desde el momento en que se pudieron distinguir distintos subtipos de VHB, se buscaron posibles asociaciones con estados patológicos o marcadores de replicación del virus, de forma que el subtipado permitiera establecer un pronóstico sobre la evolución del paciente.

Algunos autores encontraron el subtipo ad con más frecuencia que ay en pacientes persistentemente infectados, mientras que en casos de hepatitis agudas ocurría lo contrario, sugiriendo que las infecciones agudas por ad tendrían menor expresión clínica pero persistirían con mayor frecuencia (104,106,110), aunque asociadas a síntomas hepáticos más leves que las infecciones crónicas por ay (104). Algunos estudios que comparaban la distribución de subtipos en donantes de sangre y en pacientes con hepatitis B postransfusional, mostraron que el subtipo ay es más frecuente en los últimos, sugiriendo que presenta una mayor infecciosidad que ad (106). Sin embargo, fueron varios los trabajos que, al estudiar series temporales de pacientes con hepatitis B aguda durante los años 70, encontraron un aumento progresivo de las infecciones por subtipo ay asociado al aumento del consumo de drogas de administración parenteral (105,111,112). Los pacientes con hepatitis crónica habían sido infectados años atrás, mayoritariamente por ad, mientras que la mayor prevalencia de ay en pacientes con hepatitis aguda reflejaba únicamente la reciente introducción de este subtipo. Posteriores estudios sobre muestras de pacientes infectados experimentalmente por ambos subtipos (113) afianzaron la idea mayoritariamente aceptada de la falta de relevancia del subtipo en la patología producida por la infección (109, 113, 114). Sin embargo, se ha encontrado una presencia significativamente más alta del subtipo ay en portadores crónicos HBeAg positivos, mientras que ad parece predominar en los anti-HBe positivos (115). Recientemente (116), se ha descrito una mayor prevalencia de HBeAg, así como mayores títulos de HBsAg en los portadores infectados por adr en comparación con adw, sugiriendo que este subtipo causa infecciones más tendentes a inducir replicación viral persistente.

D) VARIABILIDAD DEL VHB. VARIANTES ANOMALAS

Consideraremos como tales a aquellas que producen infecciones con unas pautas de patogenicidad o epidemiología infrecuentes, o que causan resultados atípicos en los métodos de diagnóstico de la infección. En algunos casos acaban detectándose con suficiente frecuencia como para considerarlas finalmente dentro de la variabilidad "normal" del virus. Antes de pasar a ocuparme de ellas, conviene citar algunas revisiones, necesariamente recientes, que recogen la información disponible en estos momentos (117, 118, 119).

d.1 Variantes en HBsAg

d.1.a Coexistencia de determinantes de subtipo mutuamente excluyentes

La existencia de sueros de pacientes portadores de HBsAg reactivos simultáneamente para los determinantes d e y (subtipos adyw, adyr) o para los determinantes w y r (subtipos adwr, aywr), e incluso para los cuatro (adywr), fue puesta de manifiesto desde los primeros estudios de distribución de subtipos (110, 113, 120, 121, 122). Su frecuencia oscila, según los autores, entre un 0.6% y un 1.5%, al usar ensayos de subtipado con fase de captura de antisueros policlonales o anticuerpos monoclonales específicos frente a determinante común. En este tipo de ensayo, si estuviera presente una mínima cantidad de partículas de una especificidad en coexistencia con un exceso de otras portando el determinante contrario, no serían detectadas, al competir desfavorablemente por el reactivo de captura. Sin embargo, Kanagawa y colaboradores (116) ensayaron muestras previamente subtipadas como adw o adr por este tipo de métodos, en un enzoinmunoanálisis de captura con un monoclonal de especificidad w, y un conjugado de especificidad r, encontrando reactividad, y por ende demostrando coexistencia de determinantes w/r, en un 10% de ellas.

Al separar los diferentes tipos de partículas coexistentes en el suero de estos pacientes mediante cromatografía de afinidad (75, 123) se encontraron tanto unas con especificidad múltiple, como otras que expresaban un subtipo normal. En dos pacientes adywr (75) se pudieron observar patrones tan complejos como 2% de adywr, 10% adyr, 1% adwr, 64% ayr, 5% adw, 18% adr en un caso, o 11% adywr, 1% adwr, 6% ayw, 82% adr en el otro.

Al expresar por separado genomas de VHB procedentes de las fracciones antigénicamente mixtas, se obtuvieron siempre partículas de un solo subtipo normal (44,75), indicando que las partículas mixtas se generan por mezcla fenotípica al concurrir en el mismo hepatocito dos cepas de distinto subtipo, sin que se produzca recombinación entre ellas de forma que se genere una variante que codifique para ambos determinantes excluyentes (mezcla genotípica). No se puede, pues, hablar de variantes víricas con coexistencia de determinantes excluyentes. Sin embargo, estos "subtipos mixtos" si que han podido ser generados *in vitro* por mutagénesis dirigida (71).

Un individuo puede llegar a estar infectado por dos cepas distintas a través de dos mecanismos distintos:

Infección doble o sucesiva. Se ha podido comprobar en individuos infectados experimentalmente por una mezcla de sueros adw y ayw (113), subtipándose algunos de los sueros como adyw. Este mecanismo es fácilmente aplicable a los casos de pacientes con riesgo elevado de sufrir numerosas reinfecciones por VHB como internos en clínicas de deficientes mentales (120) o politrasfundidos (110), pero no a poblaciones como los donantes de sangre (122).

Salto antigénico por mutación en residuos clave para la expresión de determinantes de subtipo. Hemos visto en apartados anteriores como puede producirse un cambio de subtipo mediante una simple mutación puntual en el aminoácido 122 (d/y) o 160 (w/r) del gen del HBsAg. En algunos casos de coexistencia de determinantes de subtipo generados por mezcla de dos subtipos simples, se ha podido comprobar que los genomas de éstas solo diferían en unos pocas posiciones (44, 74), pudiéndose haber generado una a partir de la otra. En otros casos, la divergencia entre ambas es excesivamente alta, apoyando el mecanismo anterior (74). La presencia de este tipo de mezclas, ha sido asociada

a marcadores de alta replicación viral (116).

d.1.2 Variantes defectivas en determinantes de subtipo

Los pocos casos detectados de ausencia de reactividad para ambos miembros de una pareja de determinantes de subtipo mutuamente excluyentes, aun en presencia de determinante común, se achacó a la escasa sensibilidad de los primeros ensayos de subtipado. Sin embargo, estas variantes han sido detectadas más recientemente mediante enzimoimmunoensayos con anticuerpos monoclonales (122), aunque con una prevalencia muy baja (0.08%), en un grupo de más de 5000 donantes de sangre portadores de HBsAg.

El genoma viral presente en algunos de estos casos fue posteriormente caracterizado (46). En una variante sin expresión de determinante *w/r* (ad-), se encontró la mutación Lys → Asn en el aminoácido 160, el cual, como sabemos, es clave para la expresión del determinante *w/r*, siendo siempre Lys en subtipos con determinante *w* y Arg en *r*. Al revertir el mutante a Lys, se obtuvo un subtipo adw.

En dos variantes con ausencia de expresión *d/y* (a-r), el aminoácido 122, clave para este determinante, resultó ser Lys, como en cualquier subtipo que exhiba el determinante *d*. Sin embargo, una de ellas presentaba una mutación en el aminoácido 145 (Gly → Ala), y otra en el 144 (Asp → Glu). Cuando ambas fueron revertidas se expresaba determinante *d*. Como veíamos en apartados anteriores, los residuos 144 y 145 están directamente implicados en epítomos del determinante *a*, pero no de *d/y*. Sin embargo, si que podría afectar a la estructura espacial de la molécula, de forma que no fuera adecuada para la expresión de los determinantes de subtipo.

Una de estas variantes ha sido encontrada en un caso de desarrollo de antigenemia en un paciente con títulos protectores de anti-HBs de especificidad ay (124). Sin embargo, en este caso no se ha caracterizado la mutación responsable.

d.1.3 Variantes defectivas en determinante común

Consideraremos en este apartado aquellas variantes víricas que únicamente

presentan alteraciones en su reactividad con reactivos específicos para el determinante a, escapando a la protección de los anticuerpos inducidos por la infección natural o la vacuna y siendo capaces de inducir la aparición de marcadores serológicos de infección en pacientes considerados como inmunes.

La primera de ellas se descubrió en neonatos que habían sido sometidos a inmunoprofilaxis activa y pasiva por haber nacido de madres portadoras, desarrollando, sin embargo, una hepatitis aguda (125). El virus responsable no era reconocido por algunos anticuerpos monoclonales de especificidad a, y presentaba la mutación Gly → Arg en la posición 145 (126). Se han descrito casos similares en Singapur (117), Inglaterra (127) y Japón (128). En uno de los casos de Japón, la mutación responsable no se localizaba en 145, sino en 126 (Thr o Ile → Asn). La mutación en 145 se ha encontrado también en dos pacientes trasplantados de hígado que desarrollaron antigenemia mientras eran sometidos a profilaxis con un anticuerpo monoclonal específico frente a determinante común (129). En uno de los casos, la mutación en 145 era acompañada de cambios en otros aminoácidos, como el 129 o el 131. En otro caso, coexistía con cepas mutadas en 124. Un tercer paciente del mismo estudio presentaba otra variante diferente con mutaciones en 137 (Cys → Tyr) y en 141 (Lys → Ile), en lugar de en 145. En un individuo con coexistencia de HBsAg y anti-HBs se ha descrito otra variante con mutaciones en 126 (Thr o Ile → Ser) y en 133 (Met → Thr) (130).

En la figura 8 se representa la posición de las mutaciones encontradas, presentes en ambos bucles del dominio hidrofílico externo del HBsAg. El denominador común a todas estas variantes es haber sido seleccionadas, aparentemente, por presión inmunológica.

El efecto antigénico de la mutación en 145 ha sido estudiado en mutantes experimentales, encontrándose que no solo suprime la reactividad con anti-HBs procedente de individuos vacunados o convalecientes de una infección natural por una cepa normal, sino que también reduce considerablemente el título de anticuerpos obtenido por inmunización de ratones. La reactividad frente a anticuerpos monoclonales dirigidos frente a epítomos presentes en la secuencia 139-147 se vio totalmente abolida (131).

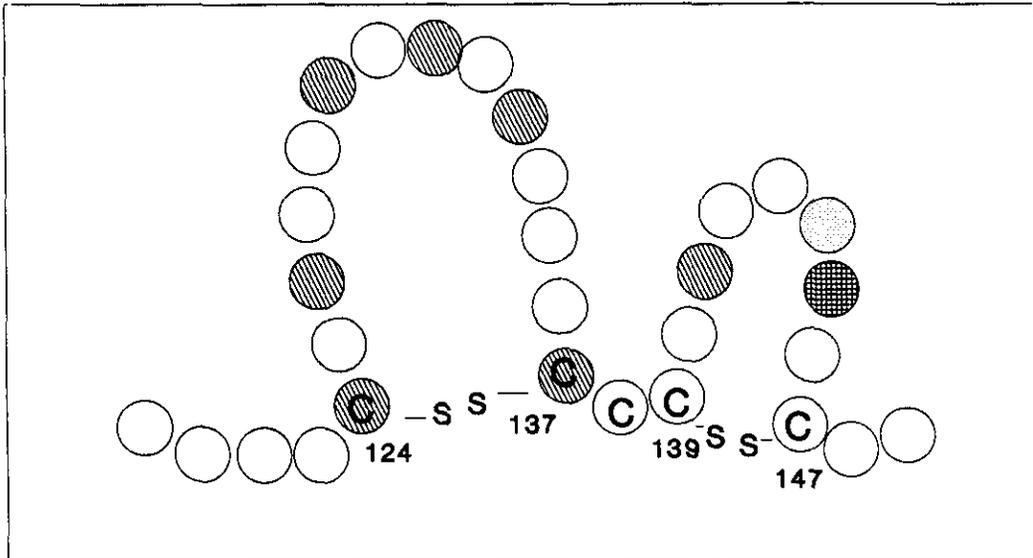


Figura 8.- Situación de las mutaciones descritas en variantes defectivas en:

- determinante común
- determinante d/y de subtipo
- ⊗ uno u otro según el artículo

Los residuos marcados con C corresponden a cisteínas, indicándose los puentes disulfuro responsables de la formación de bucles antigénicos. Los números indican la posición dentro de la secuencia del HBsAg.

d.1.4 Hepatitis B en ausencia de HBsAg

La detección de ADN de VHB por hibridación en suero e hígado de pacientes con ausencia de marcadores de infección por el Virus de la Hepatitis B ha sido puesta de manifiesto en casos de individuos con afectación hepática no atribuible a otros agentes. La introducción de la reacción en cadena de la polimerasa ha incrementado el número de casos descritos permitiendo, además, la secuenciación del genoma detectado. Se han encontrado diversas mutaciones puntuales que afectan a casi todos los genes, pero que no explican por si mismas el fenómeno en ninguno de los casos. En el momento actual, no cabe, pues, hablar de variantes víricas en estos casos. Sin embargo, algunos de los casos con otros marcadores de infección presentes podrían ser debidos a variantes defectivas en determinante común, indetectables con los equipos de diagnóstico comerciales (118). Para una completa información sobre el tema, aparte de las revisiones citadas al principio del apartado D, citaremos la de Bréchet y colaboradores (20).

d.2 Variantes en otros componentes

d.2.1 Variantes en pre-S

El virus de la hepatitis B es capaz de infectar persistentemente a un paciente durante años, de tal manera que se pueden generar mutaciones, seleccionándose aquellas que favorezcan los mecanismos de persistencia. En algunos pacientes con hepatitis crónica, e incluso carcinoma hepático, se han detectado variantes con deleciones en la región pre-S (132,133,134,135). Algunas de ellas afectan al codon de iniciación de pre-S2, aboliendo la expresión de sus productos y demostrando que no son imprescindibles para la replicación viral. Otras suprimen fragmentos que contienen los epítomos principales de pre-S1 y/o pre-S2, conservando, sin embargo, aquellas regiones de la molécula necesarias para la replicación viral, como el sitio de unión a receptor celular de pre-S1. Estos mutantes carentes de las regiones de reconocimiento por el sistema inmune podrían ser seleccionados frente a las cepas salvajes, susceptibles a la presión inmunológica, favoreciendo la persistencia del virus. Sin embargo ha de avanzarse

más en la verificación de la capacidad replicativa de estas variantes.

d.2.2 Variantes en pre-core y core.

Las cepas incapaces de producir HBeAg debido a mutaciones en la región pre-core, que generan un codón de terminación prematuro, fueron mencionadas al hablar de la patogenia del VHB. Han sido encontradas con una frecuencia muy alta en pacientes crónicamente infectados en todo el mundo, aunque en algunas zonas geográficas como los países mediterráneos y Extremo Oriente parecen especialmente frecuentes. Los pacientes positivos para anti-HBe con síntomas hepáticos crónicos parecen portar dichas variables, que se generan a partir de cepas salvajes con capacidad de producir HBeAg, seleccionándose por su capacidad de escape a la respuesta celular dirigida frente al HBeAg. En el momento de emerger, se produce la seroconversión a anti-HBe, que suele ir acompañada de una exacerbación de los síntomas hepáticos que puede ser transitoria o persistente. En cualquier caso, la presencia de estas cepas defectivas en la producción de HBeAg parece ser un hecho frecuente en el transcurso de las infecciones crónicas. Se han encontrado también mutaciones en las secuencias de la proteína de nucleocápside cuyo significado patogénico es incierto.

La importancia de estos temas ha generado una gran cantidad de trabajos publicados en la prensa científica, cuya relación exhaustiva no es objeto de esta memoria de tesis doctoral, razón por la cual remitiremos al lector a las revisiones sobre variantes de VHB mencionadas al principio de este apartado.

d.2.3 Variantes en X.

Se han encontrado cepas con deleciones que afectan al gen X y al potenciador vírico, en pacientes con infecciones atípicas, por ausencia de los marcadores diagnósticos habituales, pero con presencia de niveles bajos de ADN viral detectables por PCR (136). Otros autores han encontrado variantes similares en casos con marcadores serológicos convencionales (137). El HBxAg es una proteína con capacidad trans-activadora, por lo que la presencia de estas proteínas truncadas podría tener algún papel en la oncogénesis del carcinoma hepatocelular.

d.3 Virus de la Hepatitis B tipo 2 (VHB2).

En 1987, Coursaget y colaboradores (138) propusieron la existencia de una nueva variante del VHB, al observar, durante el seguimiento de pacientes senegaleses que habían sido previamente inmunizados con éxito, la aparición de reactividad transitoria y a bajo nivel para HBsAg en ausencia de anti-HBc y HBeAg o anti-HBe. Se sugería la existencia de un virus relacionado con VHB que cruzaba en los ensayos de detección de antígeno. Como la vacuna frente a VHB no protegía frente a la infección por este hipotético agente, le consideraron, de forma un tanto aventurada, como un nuevo tipo del Virus de la Hepatitis B. Este mismo fenómeno ha sido descrito en Estados Unidos (139), Taiwan (140), Senegal(141), Bélgica (142), Italia (143), Francia (144) y España (145,146). Algunos autores han expresado sus dudas sobre la especificidad de la reactividad; sin embargo, ésta es neutralizable tanto con anti-HBs policlona de varias especies (138,145,146), como por anticuerpos monoclonales frente a determinante común y a determinantes de subtipo (146). Además, no sólo se han visualizado por microscopía electrónica partículas de 22 nm indistinguibles del HBsAg (138), sino que se puede detectar genoma de VHB por hibridación molecular en un 27-58% de los casos (144, 146), siempre que se usen sondas de la región de proteínas de envuelta. Los experimentos de transmisión a chimpancés, producen, igualmente, antigenemias transitorias en ausencia de cualquier otro marcador serológico, incluso en animales previamente inmunizados frente a VHB, bien por vacuna, bien por infección experimental (147). Estos patrones atípicos de reactividad han sido encontrados preferentemente en individuos asintomáticos con ligeras elevaciones de transaminasas, aunque también se ha asociado a casos de hepatitis aguda (146). Su correlación con alteraciones hepáticas crónicas no ha podido ser adecuadamente establecida. Algunos datos previos sugieren la posible transmisión oral del agente (144,146).

Existen dos tipos de hipótesis para interpretar estos hallazgos. Unas se basan en la existencia de una variante de VHB ó un virus relacionado, que estaríamos detectando como consecuencia de una reacción cruzada con el HBsAg. Las otras abogan por factores propios del huésped como causa de estas

reactividades tras la infección por VHB. Se han podido amplificar secuencias de ADN mediante iniciadores específicos de la región de nucleocápside (148) y de envuelta (149), obteniendo secuencias indistinguibles de las de VHB, excepto una mutación puntual en el aminoácido 213 del HBsAg, cuya importancia es previsiblemente escasa, ya que esta posición está lejos de las regiones que contienen los epítomos principales de la molécula. En sucesivos apartados de esta memoria de tesis, y al objeto de agilizar la exposición, me referiré a los casos que presenten estas características como casos de VHB2, sin que con ello pretenda defenderse la existencia de un tipo nuevo del Virus de la Hepatitis B.

d.4 Importancia sanitaria de las variantes de VHB.

d.4.1 Implicaciones en el diagnóstico. Patrones atípicos de marcadores de infección por VHB.

En el apartado anterior, hemos hecho mención de los patrones atípicos que pueden ser generados por las distintas variantes. No obstante, éstos son también originados por otras causas que conviene conocer, para hacernos una idea de la verdadera magnitud de los problemas diagnósticos generados por la variabilidad del virus.

Reactividad aislada para HBsAg. Puede ser debida a dos causas diferentes:

* ~~Momentos tempranos de la primo infección.~~ Para cuando aparecen los síntomas de la enfermedad, suelen estar presentes anticuerpos IgM anti-HBc y HBeAg, siendo muy inusual disponer de muestra del paciente en momentos previos a la manifestación de los síntomas. En cualquier caso, en las sucesivas muestras de seguimiento aparecerán dichos marcadores.

* VHB2. Mucho más frecuente que la situación anterior, de la que se distingue por el carácter transitorio de la antigenemia y por la ausencia de otros marcadores de infección en muestras de seguimiento.

Presencia de HBsAg y HBeAg en ausencia de anticuerpos anti-HBc. Esta situación se ha descrito tanto en infecciones congénitas (150), como en pacientes inmunodeprimidos (151). La reactividad para ambos antígenos es

elevada y persistente, encontrándose en todos los casos niveles altos de ADN viral. No se han encontrado variantes víricas asociadas a estas infecciones, obedeciendo su causa a una inmunotolerancia extrema y selectiva del huésped (152,153) a los antígenos del VHB. Pese a la presencia masiva del virus, los pacientes permanecen asintomáticos. Sin embargo, si se llegase a producir respuesta, podría producirse un episodio de hepatitis fulminante por hiperagresión inmune. Debo resaltar que se trata de un fenómeno totalmente diferente a los casos de VHB2, con los que se ha confundido en ocasiones.

Al igual que en caso anterior, este patrón puede observarse en los primeros momentos de la primoinfección, en cuyo caso detectaremos respuesta inmune frente a proteínas de nucleocápside en sucesivas muestras.

Presencia simultánea de HBsAg y anti-HBs. Este patrón se presenta con una frecuencia variable según las poblaciones estudiadas y la metodología empleada (154). Se trata de un fenómeno complejo en que podemos distinguir diversas situaciones para las que se han propuesto hipótesis particulares (154, 155).

* ~~Reactividad transitoria para HBsAg.~~ Apuntamos dos posibles explicaciones.

- Muestra recogida en el momento de la seroconversión tras la primoinfección. Deberíamos detectar anticuerpos anti-HBc de clase IgM.

- Casos de VHB2 en pacientes previamente inmunizados contra el VHB, bien por infección natural (anti-HBc positivos), bien por efecto de la vacuna (anti-HBc negativos). Los anticuerpos IgM anti-HBc estarían ausentes.

* ~~Reactividad transitoria para anti-HBs.~~ Observable tras la reactivación de infección latente, posibilidad ya apuntada al hablar de la patogenia de la infección.

* ~~Reactividad persistente para ambos marcadores, cuya especificidad de subtipo es la misma.~~ Es decir, el anti-HBs va dirigido frente al mismo HBsAg presente en la muestra, estando presentes inmunocomplejos HBsAg/anti-HBs.

* ~~Reactividad persistente para ambos marcadores, cuya especificidad de subtipo es diferente.~~ Ha sido descrito en numerosas ocasiones (156,157, 158,159,160,161,162). Se deberían a una infección doble en circunstancias excepcionales, ya que habitualmente existe inmunidad cruzada entre

subtipos:

- Infección congénita por un subtipo de VHB (ej. adw), que cronifica e induce inmunotolerancia al mismo. Si hay una infección posterior por otro subtipo (ayw), el paciente responderá con anticuerpos específicos para los epítomos característicos de éste (y), frente a los que no existe inmunotolerancia. Tabor y colaboradores (163) fueron capaces de inducir anticuerpos anti-y en un chimpancé portador de HBsAg ad, mediante la infección experimental con HBsAg ay. Sin embargo, se conocen casos en pacientes inmunocompetentes que sufrieron la primera infección siendo adultos.

- Infección por una variante defectiva en determinante común en un paciente previamente inmunizado frente a VHB, tal como describimos en el apartado correspondiente a dichas variantes.

* ~~Reactividad persistente para ambos marcadores, siendo una de ellas inespecífica.~~ Es difícil de imaginar si las especificidades se subtipan. Sin embargo, algunos autores han encontrado anti-HBs monoespecíficos producto de una reacción cruzada con sustancias desconocidas (164), por lo que no se puede descartar, en el plano teórico, esta posibilidad.

Reactividad aislada para anti-HBs en individuos sin antecedentes de vacunación. Este patrón ha sido descrito en el hombre (165,166,167) y en primates (168), que fueron susceptibles a la infección por VHB a pesar de la presencia de anti-HBs. La reactividad parece debida a una IgM inespecífica, dirigida probablemente contra alguna sustancia que comparte epítomos con el HBsAg (166,168). Por otra parte, estas reactividades han sido encontradas en animales no susceptibles de infectarse por VHB (169). Millman y colaboradores identificaron en sueros de varias de estas especies ciertas glicoproteínas con afinidad por HBsAg, que generaban resultados positivos falsos en las técnicas de detección de anti-HBs (170).

Reactividad aislada para anti-HBc. No se trata de un patrón serológico inusual, especialmente en poblaciones de alto riesgo, estando presente en,

aproximadamente, un 20% de los adictos a drogas de administración parenteral y un 17% de los varones homosexuales (171). La mayoría de los pacientes que presenta anti-HBc aislado no parecen estar infectados por el virus, tratándose, probablemente, de individuos que superaron la infección y respondieron de forma incompleta, o que, con el transcurrir del tiempo, han perdido los anticuerpos frente a proteínas de envuelta (172). Sin embargo, y tal como resaltábamos en apartados anteriores, existen cepas de HBsAg no detectables en algunos ensayos comerciales que podrían generar patrones de anti-HBc aislado. Por otra parte, diversos autores han sido capaces de amplificar genoma de VHB en algunos de estos pacientes, especialmente si presentaban hepatitis crónica (173). Además, un porcentaje de estas reactividades podrían ser inespecíficas (174).

d.4.2 Evasión a la respuesta inmune.

En apartados anteriores, indicábamos cómo las variantes defectivas en determinante común y el VHB2 eran capaces de infectar a individuos con inmunidad frente al VHB conferida, bien de forma activa tras la infección natural o la vacunación, bien de forma pasiva mediante la administración de gammaglobulina específica o anticuerpos monoclonales. Actualmente se plantea en diversos países la inclusión de la vacuna frente al VHB dentro del calendario general de vacunaciones, a fin de extender la inmunización a toda la población. La eficacia de dichas campañas de vacunación podría verse afectada si se seleccionasen estas variantes resistentes a vacuna desplazando a las cepas salvajes sensibles.

d.4.3 Implicaciones patológicas.

El Virus de la Hepatitis B es capaz de infectar al mismo individuo de forma persistente durante años, dando tiempo a que afloren variantes como las defectivas en la producción de HBeAg, cuya presencia correlaciona con estadíos avanzados de deterioro hepático, resultando, además menos sensibles al tratamiento con interferón que las cepas salvajes. Se ha descrito por algunos autores que la aparente primoinfección de individuos susceptibles por cepas pre-C defectivas condujo a episodios letales de hepatitis fulminante. En algunos casos, se identificó

la fuente de la infección, determinándose la identidad de secuencias entre los virus aislados de los casos índice y sus contactos. No obstante, el hecho de que algunos de estos pacientes presentaran HBeAg circulante en los momentos tempranos de la infección sugiere, al menos, que se infectaron por una mezcla de virus salvaje y cepa variante, por lo que la posible relación entre la hepatitis B aguda fulminante y las variantes pre-C defectivas requieren confirmación. Las posibles implicaciones patológicas de las mutaciones en otras regiones como pre-S o X, han sido puestas de manifiesto tan solo muy recientemente.

OBJETIVOS

1.- Los subtipos de HBsAg constituyen una herramienta de gran utilidad para el estudio de la epidemiología de la infección por VHB. La compleja distribución mundial de los subtipos de HBsAg, inicialmente producto de la divergencia evolutiva producida por mero aislamiento geográfico, se ve continuamente modificada por movimientos de población, de forma que la distribución actual en cada país es, a la postre, producto de su situación geográfica y de su historia. Los datos publicados sobre distribución de subtipos en España (111, 175) son escasos, antiguos, y reducidos al área geográfica de Barcelona. La situación en los países circundantes es bastante compleja, siendo prevalente el subtipo adw (adw2) en Francia y en toda Centroeuropa, mientras que el ayw (ayw2, ayw3) lo es en el norte de Africa y en la Europa mediterránea, de forma que no es posible hacer predicciones. No sería, pues, extraño que el concurrir de ambas tendencias fuese causa de diferencias geográficas de distribución de subtipos dentro del territorio español. En consecuencia, uno de los objetivos de este trabajo es **estudiar la distribución de subtipos de HBsAg en diferentes localidades a fin de detectar posibles diferencias geográficas dentro del territorio español.**

2.- La población que habita una determinada área geográfica es heterogénea, de forma que conviven en ella diferentes grupos de población, a menudo poco relacionados, estableciéndose un cierto aislamiento epidemiológico entre algunos de ellos. Algunos estudios realizados en otros países muestran diferencias de distribución de subtipos entre varios grupos de población, atendiendo a sus factores de riesgo de infección por VHB, revelando pautas de circulación del virus particulares para algunos de ellos. Es, pues, otro de nuestros objetivos **estudiar, en cada localidad, varios grupos con diferentes factores de riesgo, a fin de establecer las distintas pautas de circulación del virus en la población.**

3.- Los datos disponibles acerca de la existencia de diferencias de patogenicidad entre los distintos subtipos de HBsAg son, a menudo, contradictorios. Condicionándonos a la consecución de los dos objetivos anteriores se pretende estudiar, dentro de poblaciones homogéneas, la correlación de los diferentes subtipos detectados con la presencia de marcadores de replicación viral, con el fin de establecer posibles diferencias de virulencia entre dichos subtipos.

4.- El VHD precisa de la presencia del VHB para poder completar su ciclo de replicación, recubriéndose, incluso, con sus envueltas víricas. En este sentido, el HBsAg puede considerarse como un componente estructural del VHD, aunque codificado por el VHB. Cabe pues pensar que alguno de los subtipos de HBsAg pudiera ser más eficiente en la interacción estructural con las cápsidas del VHD, cumpliendo con mayor eficacia las funciones de ayuda necesarias para el establecimiento de la infección por VHD. Cabría esperar una mayor frecuencia de infecciones por VHD en los portadores de este subtipo. Es otro objetivo de esta tesis estudiar la frecuencia de infecciones por VHD en portadores de los diferentes subtipos de HBsAg que circulan en España, a fin de detectar si alguno de ellos es más proclive al apoyo de la infección por VHD.

5.- La presencia en España de reactividades atípicas para HBsAg, asimilables a los casos descritos en bibliografía bajo el epígrafe de infecciones por Virus de la Hepatitis B tipo 2, ha sido puesta de manifiesto con una frecuencia significativa. Dichas reactividades ocurren incluso en pacientes con inmunidad previa a la infección por HBV, razón por la cual se ha propuesto a un virus diferente, aunque relacionado, como posible agente etiológico. La caracterización de estas reactividades mediante anticuerpos monoclonales específicos de determinantes de subtipo de HBsAg, a fin de contribuir a establecer el grado de identidad del agente presente en estos casos con el VHB, es otro de nuestros objetivos.

6.- Recientemente han sido descritas en distintos países diversas variantes antigénicas capaces de eludir la inmunidad adquirida tras la infección natural por VHB o la vacunación. **Es otro de nuestros objetivos estudiar la presencia en nuestro país de variantes antigénicas de interés sanitario, y en su caso, proceder a su caracterización.**

***MATERIALES Y
METODOS***

A) PACIENTES Y MUESTRAS

a.1 Panel de referencia de subtipos de HBsAg.

Este panel fue establecido durante el "International Workshop on HBs Antigen Subtypes", celebrado en París en 1975. Incluye los nueve subtipos más una muestra positiva simultáneamente para los determinantes d e y (adyw). A continuación se indican los distintos miembros del panel, consignando entre paréntesis el número de muestra asignado durante el simposio: ayw1 (82), ayw2 (84), ayw3 (86), ayw4 (87), ayr (27), adw2 (28), adw4 (92), adrq+ (30), adrq- (35), adyw (95). Las muestras de subtipo ayw2, ayw3 y adw4 no contenían ADN de VHB detectable por PCR con los iniciadores generales, por lo que fueron sustituidas en los ensayos de PCR por otras del mismo subtipo caracterizadas igualmente durante el Simposio de París, y procedentes del Centro Nacional de Transfusión Sanguínea de París.

a.2 Casos estudiados

Setecientos noventa y tres casos de pacientes positivos para antígeno de superficie de los que, como norma general, se analizó una sola muestra, excepto cuando los resultados de subtipado fueron de difícil interpretación, en cuyo caso se obtuvieron muestras de seguimiento siempre que fue posible.

*** GRUPO 1: Quinientos cincuenta y dos pacientes españoles con marcadores serológicos compatibles con infección por el Virus de la Hepatitis B.** La tabla I recoge la clasificación de estos pacientes por la presencia de factores de riesgo de infección por VHB y por localidades.

TABLA I: grupo 1

LOCALIDAD	Subgrupo a No RIESGO	Subgrupo b ADVP	Subgrupo c OTROS	TOTAL
MADRID	60	50	38	148
ASTURIAS	33	53	55	141
ZARAGOZA	33	25	--	58
MALAGA	47	28	--	75
BARCELONA	--	25	--	25
VALLADOLID	24	--	--	24
NAVARRA	27	--	--	27
SEVILLA	47	--	--	47
OTROS	4	2	1	7
TOTAL	275	183	94	552

- Subgrupo 1.a: Pacientes sin prácticas riesgo conocidas para la infección por VHB.

Dentro de este subgrupo, existen dos tipos diferentes de pacientes:

Donantes de sangre no remunerados. Todos aquellos procedentes de Asturias (Laboratorio de Salud Pública del Principado de Asturias), Zaragoza (Hospital Miguel Servet), Málaga (Banco de Sangre de Málaga), Navarra (Banco de Sangre de Navarra) y Sevilla (Centro Nacional de Transfusión Sanguínea de Sevilla).

Pacientes con hepatopatías pero sin prácticas de riesgo conocidas de infección por VHB Todos aquellos procedentes de Madrid (Centro Nacional de Microbiología Virología e Inmunología Sanitarias, y Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus. Instituto de Salud Carlos III) y Valladolid (Hospital Universitario).

- Subgrupo 1.b: adictos a drogas de administración parenteral (ADVP) Todos ellos son pacientes atendidos en centros sanitarios por problemas que no necesariamente tienen que ver con su condición de portadores de HBsAg. Los procedentes de Madrid, Asturias y Zaragoza provienen de los mismos centros que los del subgrupo 1.a, mientras que los de Málaga proceden del Hospital Carlos Haya y los de Barcelona del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

- Subgrupo 1.c: otros riesgos. Engloba a pacientes con diferentes factores de riesgo de infección por VHB, siempre que no sean adictos a drogas de administración parenteral, en cuyo caso se englobarían en el subgrupo 1.b. En la tabla II se detalla la composición del subgrupo en cada localidad. La procedencia de las muestras es la misma que en los apartados anteriores.

TABLA II: subgrupo 1.c

LOCALIDAD	CA	PS	HO	DM	PR	SX	CF	TF	TT	OT	TOT
Madrid	10	3	12	1	3	5	2	1	1	0	38
Asturias	24	11	0	6	4	1	4	0	0	5	55
Total	34	14	12	7	7	6	6	1	1	5	93

CA= Reclusos, PS= personal sanitario, HO= varones homosexuales, DM= deficientes mentales recluidos en instituciones especiales, PR= prostitutas, SX= otros riesgos de transmisión sexual, CF= convivencia con algún portador de HBsAg, TF= transfusiones, TT= tatuajes y OT= Pacientes seleccionados para vacunación por causas no conocidas.

* **Grupo 2:** noventa y cuatro pacientes procedentes de Madrid con patrones atípicos de marcadores serológicos que denominaremos como casos de VHB2, esto es, reactividad para HBsAg neutralizable por anti-HBs policlonal en ausencia de otros marcadores serológicos de infección por VHB. De manera análoga al grupo 1, se han dividido en tres subgrupos. Las muestras proceden del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias, Centro Nacional de Biología Celular y Retrovirus y Hospital doce de Octubre.

- Subgrupo 2.a: sin riesgos conocidos de infección por VHB. Sesenta y cuatro pacientes.

- Subgrupo 2.b: adictos a drogas de administración parenteral. Nueve pacientes

- Subgrupo 2.C: otros riesgos Veintiún pacientes (8 reclusos, 5 alta promiscuidad sexual, 2 varones homosexuales, 2 familiares de portadores de HBsAg, 2 han sufrido exposición accidental a HBV, 1 politrasfundido, 1 trabajador sanitario).

* **Grupo 3:** Ciento cuarenta y siete pacientes internados en instituciones cerradas.

- Subgrupo 3.a: veintiún reclusos internados en la misma prisión, diez de los cuales presentan patrones atípicos de marcadores serológicos compatibles con infección por VHB2, según los criterios definidos para el grupo 2.

- Subgrupo 3.b: ciento veintiseis deficientes mentales internados en instituciones especiales. En la tabla III se detalla la distribución por instituciones.

Tabla III: subgrupo 3.b

PROVINCIA	INSTITUCION	TIPO DE CASO		TOTAL
		VHB	VHB2	
Madrid	MD1	11	16	27
Segovia	SG1	7	0	7
	SG2	7	0	7
	SG3	1	0	1
Palencia	PA1	29	0	29
	PA2	30	0	30
	PA3	2	0	2
	PA4	9	6	15
Zamora	ZA1	3	0	3
	ZA2	1	0	1
Valladolid	VA1	5	0	5
	VA2	7	0	7
	VA3	2	0	2
TOTAL		114	22	126

Los criterios definatorios de los casos de HBV2 son los mismos que en los grupos anteriores, excepto para el caso de la institución MD1, donde se dispuso de muestras de seguimiento de todos los pacientes, lo cual permitió incluir casos en los que, a pesar de estar presentes anti-HBc totales y anti-HBs (12 casos) o solamente anti-HBs (2 casos), la reactividad para HBsAg fue transitoria, desapareciendo en las muestras de seguimiento. La alta tasa de infección por VHB en este tipo de pacientes justifica la presencia de marcadores de exposición previa a VHB (anti-HBc y anti-HBs) en la mayoría de ellos, así como los antecedentes de vacunación (anti-HBs en ausencia de anti-HBc) en otros dos. La infección por VHB2 aparece superpuesta sobre dichos marcadores (138).

B) SUBTIPADO HBsAg. METODOS ANTIGENICOS.

b.1 Reactivos inmunológicos específicos de determinantes de subtipo.

b.1.1 Anticuerpos monoclonales

En la tabla IV figuran los anticuerpos monoclonales utilizados con indicación de su especificidad y procedencia.

Tabla IV: anticuerpos monoclonales

	Especificidad				
	a	d	y	w	r
A)	H35C	H95C	H10C	-	-
B)	4B5	M5H7	4C6	-	-
C)	3207	3423	3457	4111	313
D)	1DE2 3AD5	-	-	-	-

A) Laboratorios ABBOTT. Chicago, USA.

B) SQRIN BIOMEDICA. Saluggia, Italia.

C) Componentes del Kit HBsAg subtype EIA del Instituto de Inmunología de Tokyo.

D) BLOKIT S.A. Barcelona, España.

Los anticuerpos monoclonales H35C, H95C y H10C fueron descritos y adecuadamente caracterizados por Peterson y colaboradores (63), al igual que el 3423, 3457, 4111 y 313 por Usuda y colaboradores (82), habiéndose empleado en varios trabajos publicados posteriormente. El 4B5, M5H7 y 4C6 han sido usados para la descripción de variantes defectivas en determinante común (126), sin que se aporte, sin embargo, la caracterización de los mismos con paneles adecuados. No existe nada publicado acerca de 1DE2 y 3AD5.

b.1.2 Antisueros policlonales.

Los análisis con antisueros policlonales fueron realizados por la Doctora Ann M. Couroucé, en el Instituto Nacional de Transfusión Sanguínea de París. Dichos antisueros fueron los mismos que los empleados en el simposio de París donde se establecieron definitivamente los subtipos de HBsAg (27), siendo por tanto, los reactivos de referencia.

b.2 Técnicas.

b.2.1 Enzimoimmunoanálisis (EIA) indirecto.

Sobre placas de titulación de 96 pocillos recubiertas con anti-HBs policlonal de cobaya (BIOKIT S.L.), se añadieron 100 μ l del suero problema y se dejaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Se incluyeron tantas réplicas de la muestra problema como anticuerpos monoclonales, y, además, una como control de fondos. A continuación se lavó cuatro veces con un tampón fosfato (PBS) con Tween 20 al 0.1%, para luego añadir 100 μ l de cada anticuerpo monoclonal en el correspondiente pocillo, sustituyéndola por un volumen igual de suero de ternera en el control. Tras una incubación de una hora a 37°C se lavó de la misma manera que antes, para añadir posteriormente 100 μ l de anti-IgG de cobaya (cabra) conjugado con peroxidasa (DAKO). Después de una incubación de una hora a 37°C, se repitieron los lavados, para revelar, posteriormente, la presencia de peroxidasa con 100 μ l de ortofenilendiamina (ABBOTT). La reacción de color fue detenida al cabo de media hora con 75 μ l de ácido sulfúrico 4N, leyéndose las absorbancias en un espectrofotómetro a 492 nm de longitud de onda. Tanto los anticuerpos monoclonales como el conjugado fueron diluidos en suero de ternera hasta su concentración de uso.

La absorbancia neta se calculó restándole a cada pocillo la del control.

En cada ensayo se incluyeron como controles un suero negativo para HBsAg, un suero ad y un ay.

b.2.2 EIA neutralización.

Este método es una simple modificación de un método comercial de detección de HBsAg (AUSZYME MONOCLONAL EIA. Laboratorios ABBOTT). Ciento ochenta μl de la muestra problema se mezclaron con 20 μl de AcM, incluyendo, al igual que en el caso anterior, un control en el que el AcM fue sustituido por un volumen igual de suero de ternera. Tras media hora a 37°C, se determina el HBsAg libre siguiendo las instrucciones del ensayo comercial. Dicho ensayo consiste en la captura del HBsAg en esferas de poliestireno recubiertas con un AcM específico de determinante común, y la detección del mismo con otro anticuerpo monoclonal de la misma especificidad conjugado con peroxidasa. Cuando el HBsAg problema contenga la especificidad reconocida por el AcM ensayado, éste se unirá a él, acomplejándolo, e impidiendo su unión al AcM de la fase sólida. El resultado se expresó como porcentaje de reducción de lectura con respecto al control, según la fórmula:

$$\% \text{ neut} = \frac{\text{Abs con} - \text{Abs AcM}}{\text{Abs con}} \times 100$$

Donde % neut es el porcentaje de neutralización, Abs con es el valor de absorbancia obtenido para el pocillo control y Abs AcM es el valor de absorbancia obtenido con el anticuerpo monoclonal en cuestión.

Se consideró que una muestra fue reconocida por el anticuerpo monoclonal cuando el porcentaje de neutralización obtenido fue superior a 50. Por el contrario, el resultado se considera negativo por debajo de un 30%, quedando aquellas entre un 30 y un 40% como indeterminadas. La muestra debe ser ensayada a una dilución tal que el pocillo control rinda un valor de absorbancia contenido en la zona lineal del ensayo (inferior a 2.000). Además de los controles del equipo comercial, se incluyeron en cada ensayo un suero ad y un ay. Como se indicaba en el apartado anterior, la reactividad para HBsAg fue comprobada en todos los casos de HBV2 por un método similar a este ensayo de neutralización, pero sustituyendo los AcM por un anti-HBs policlonal de carnero.

b.2.3 EIA Inhibición

Este ensayo mide la capacidad del HBsAg problema para inhibir la unión de un AcM a un HBsAg que se encuentra recubriendo la superficie de un pocillo de una placa de poliestireno. Cien μl de la muestra problema se hicieron reaccionar durante una hora a 37° , con 10 μl de anticuerpo monoclonal, tras lo cual se añadieron 100 μl de la mezcla sobre un pocillo de una placa de microtitulación recubierto de HBsAg (ad + ay) (BIOKIT S.L.) y se dejó una hora a 37°C . En el ensayo se incluyó también un pocillo control de señal de base, en el que se sustituyó la muestra por suero de ternera. A continuación, lavamos y detectamos el AcM ligado a la fase sólida de la misma forma que en el EIA indirecto.

El resultado se expresó como el porcentaje de reducción de lectura con respecto al pocillo control, calculado según la fórmula:

$$\% \text{ Inh} = \frac{\text{Abs base} - \text{Abs muestra}}{\text{Abs base}} \times 100$$

Donde % Inh es el porcentaje de inhibición, **Abs base** es la absorbancia obtenida para el control, y **abs muestra** es la absorbancia obtenida para la muestra.

Los criterios de valoración de los porcentajes son los mismos que en el ensayo de neutralización. Además del control de señal de base para cada AcM, se incluyeron en cada ensayo un suero ad y uno ay.

b.2.4 Ensayo comercial del Instituto de Inmunología de Tokio. (HBsAg Subtype EIA kit)(69)

Es un EIA en el que el HBsAg es capturado mediante una fase sólida recubierta con un AcM anti-a, para ser posteriormente detectado cada determinante de subtipo con un AcM específico conjugado con peroxidasa. Los AcM empleados son los indicados en la tabla IV con la letra C. El equipo incluye reactivos específicos de determinantes d, γ , w, r. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

b.2.5 Contrainmunolectroforesis

Los ensayos fueron realizados por la Doctora A.M. Couroucé del Instituto Nacional de Transfusión Sanguínea de París, según el método previamente descrito (27).

C) SUBTIPADO DE HBsAg. PCR.

c.1 Iniciadores de replicación. Fundamento.

Se utilizaron cuatro iniciadores diferentes (figura 9). D122 e Y122 son colineares (posiciones 537-519 de la secuencia del ADN de VHB (176), difiriendo únicamente en sus extremos 3', que se corresponde con la segunda base del triplete de la posición 122 de la molécula del HBsAg. Recordemos que dicha posición es siempre Lys (A) en ad y Arg (G) en ay, de forma que el extremo 3' de D122 hibrida con las secuencias ad, quedando desapareado en las ay. De manera inversa, el extremo 3' de Y122 queda apareado con secuencias ay pero no con ad. Los iniciadores T68 e Y68 son, igualmente, colineares (posiciones 339-357) difiriendo únicamente en sus extremos 3'. En este caso, T68 hibridaría con aquellos subtipos que presenten timidina en la posición 357 (adw2, adr, ayw1, ayw4, ayr), mientras que C68 lo haría con los que presentasen C (adw4, ayw2, ayw3). El iniciador T68 es idéntico al Hep7 de Norder y colaboradores (85).

Ensayando las cuatro combinaciones posibles (T68/D122, T68/Y122, C68/D122, C68/Y122) obtendremos siempre fragmentos de 198 pares de bases.

Las muestras fueron también ensayadas con una pareja de oligonucleótidos de una región conservada de la región de nucleocápside de la secuencia del ADN de HBV (177).

Los iniciadores fueron obtenidos en un sintetizador de oligonucleótidos (Gene Assembler, Pharmacia) y purificados por cromatografía líquida de alta resolución.

T68	D122
	TCTGGACGTGCTGAGGACG -5'
5' - CAACCTCTTGTCTCCAAT	AGACCTGCACGACTCCTGC
adw ^{a(3)} -----C-----T	AA-----
adw ^c -----G-----T	A-----A-----
adw ^c -----G-----T	AA-----A-----
adw ^c ----T-G-----G-T	AA-----
adw2 ^b -----C-----T	AA-----
adw4 ^{b(2)} -----C-----C	AA-----A----T---
adr ^{a(5),d} -----T	A-----T-----
adrq+ ^b -----T	A-----T-----
ayw ^a -----C	G-----T---A----
ayw ^a -----C-----C	GA-----
ayw1 ^b ----T-G-----T	GA-----
ayw1 ^b -----C-----T	GA-----
ayw2 ^b -----C-----C	GA-----
ayw3 ^b -----C-----C	GA-----T---AA----
ayw4 ^b -----T	GA-----T---
ayw4 ^b -----T	GA-----T---T---
ayr ^b -----T	GA-----T-----
ayr ^a -----C	G-----
5' - CAACCTCTTGTCTCCAAC	GGACCTGCACGACTCCTGC
	CCTGGACGTGCTGAGGACG -5'
C68	Y122

Figura 9: Fundamento del método de subtipado por PCR (ver texto). Se muestran a los iniciadores (en negrita) alineados con veintiséis secuencias publicadas de todos los subtipos conocidos, aunque para algunas de ellas no se citan las subespecificidades por no figurar en los trabajos correspondientes. Aquellas posiciones implicadas en la especificidad del ensayo, aparecen en cursiva.

^aOnce secuencias iguales previamente publicadas, pero comparadas por Orito y colaboradores (178).

^bTomadas de Norder y colaboradores (47)

^cTomadas de OKamoto y colaboradores (45)

^dTomadas de Rho y colaboradores (179)

Los números entre paréntesis que acompañan a algunas citas se refieren a la cantidad de secuencias exactamente iguales tomadas de dicha publicación.

c.2 Extracción de ADN

El ADN problema fue extraído mediante tratamiento con NaOH según Kaneko y colaboradores (180). Veinte μl de cada suero se mezclaron con 80 μl de NaOH 0.125 N (concentración final 0.1 N). Tras una incubación de una hora a 37°C el extracto se neutralizó con 10 μl de HCl 1N y se clarificó por centrifugación (5 minutos a 12000 g).

c.3 Amplificación

Se añadieron diez microlitros de extracto en una mezcla de reacción que contenía 0.5 μM de cada iniciador, 2 mM de MgCl_2 , 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 8.3 y 2.5 unidades de Taq polimerasa (Ampli Taq, Perkin Elmer Cetus), hasta un volumen final de 100 μl , cubriéndose con dos gotas de aceite mineral. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (PHC3, Tecne), en las condiciones de la figura 10.

c.4 Detección de las secuencias amplificadas.

Quince μl de los productos finales se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 4% (3% Nu Sieve, 1% de Sea Kem) con 0.5 $\mu\text{g/ml}$ de bromuro de etidio, en tampón TBE, visualizando el resultado en un transiluminador de luz ultravioleta.

D) SECUENCIACION

Varias muestras fueron enviadas al Dr. Bill Carman del Instituto de Virología de Glasgow para su secuenciación según un protocolo descrito (126).

Otras fueron enviadas al Dr. Lars Magnus del Laboratorio Nacional de Bacteriología de Estocolmo, siendo secuenciadas tal como describen en sus trabajos (48).

Básicamente, ambos protocolos consisten en una amplificación previa por PCR de un fragmento que contiene la región a estudiar, mediante unos iniciadores que hibridan en una zona conservada, para luego secuenciar directamente los amplificados sin previo clonaje. Este principio ha de ser tenido en cuenta en la interpretación de los resultados.

a) Reactivos de subtipado

	<u>1 ciclo</u>		----->	<u>38 ciclos</u>		----->	<u>1 ciclo</u>	
	<u>Tiemp</u>	<u>Temp</u>		<u>Tiemp</u>	<u>Temp</u>		<u>Tiemp</u>	<u>Temp</u>
Desnaturalización	5'	96°C		30''	96°C		30''	96°C
Hibridación	30''	55°C		30''	55°C		30''	55°C
Elongación	1'	74°C		1'	74°C		5'	74°C

b) Reactivos generales

	<u>1 ciclo</u>		----->	<u>38 ciclos</u>		----->	<u>1 ciclo</u>	
	<u>Tiemp</u>	<u>Temp</u>		<u>Tiemp</u>	<u>Temp</u>		<u>Tiemp</u>	<u>Temp</u>
Desnaturalización	1'	96°C		30''	96°C		30''	96°C
Hibridación	30''	55°C		30''	55°C		30''	55°C
Elongación	1'	72°C		1'	72°C		10'	72°C

Figura 10: Protocolo de amplificación usado en las técnicas de PCR.

Tiemp = tiempo

Temp = temperatura

F) PROTOCOLO DEL ESTUDIO

Todas las muestras fueron primeramente estudiadas a dilución 1/10 con los anticuerpos monoclonales H35C, H95C y H10C por EIA indirecto. Las que presentaron valores de absorbancia neta inferiores a 0.100 fueron ensayadas de nuevo sin diluir. Las positivas (absorbancia > 0.100) para H35C y para alguno de los dos AcM de subtipo y con un cociente $AbsH95C/AbsH10C > 5$ fueron clasificadas como ad, mientras que si el cociente $AbsH10C/AbsH95C > 5$, entonces se consideran ay (el dividendo y el divisor representan absorbancias netas).

Las muestras positivas para los tres AcM y con ambos cocientes inferiores a 5, fueron consideradas indeterminadas y seleccionadas para su estudio por el resto de las técnicas.

Aquellas positivas únicamente para el AcM H35C se consideraron indeterminadas, seleccionándose para su estudio con el resto de las técnicas.

Aquellas finalmente negativas para los tres AcM se estudiaron por neutralización con los AcM H35C y H95C. Cuando el resultado fue positivo para ambos se consideraron ad, quedando clasificada como ay, por exclusión, cuando sólo lo fue para H35C. Cuando alguno de los dos resultados fue indeterminado se repitió el análisis. En caso de persistir, se seleccionaron para posteriores estudios. Cuando una muestra se agotó sin que pudiera repetirse el ensayo, quedó excluida del estudio.

La distribución de subtipos obtenida fue estudiada mediante análisis de tablas de contingencia por el método de la "chi cuadrado", realizándose la corrección de Yates siempre que el tamaño de la muestra lo requirió. Se consideraron significativos valores de $p < 0.05$. Los cálculos se realizaron con el paquete estadístico STATGRAPHICS versión 4.00.

***RESULTADOS Y
DISCUSION***

A) PUESTA A PUNTO Y COMPARACION DE METODOS

a.1 Métodos antigénicos

a.1.1 Especificidad

En la tabla V se muestran los resultados obtenidos tras analizar el panel de referencia de HBsAg por EIA indirecto con todos los AcM, excepto 3423, 3457, 4111 y 313, cuyos resultados han sido tomados de bibliografía (82), al tratarse de componentes de un ensayo comercial.

Tal como era de esperar, los cuatro anticuerpos monoclonales específicos de determinante común reconocieron a todos los miembros del panel. El AcM 3207 es el empleado en el equipo comercial para capturar el HBsAg antes de ensayar los AcM 3423, 3457, 4111 y 313. Al ser todas las muestras del panel reconocidas por, al menos, dos de estos AcM, podemos deducir que todas ellas reaccionaron previamente con 3207 en la fase de captura.

Los anticuerpos monoclonales H95C y 3423 reaccionaron con todos los miembros ad y con ninguno de los ay, tal y como corresponde a su especificidad. Las señales obtenidas para los dos miembros adr con el M5H7, sin embargo, fueron inferiores al valor de corte (0.100) con la dilución de uso seleccionada. A diluciones menores se obtuvieron señales superiores, pero, a la vez, surgían problemas de cruce con los subtipos ay. Finalmente, se decidió usar la concentración de uso más adecuada para el subtipado de adw, evitando cruces con ay, ya que no esperábamos la presencia de adr en nuestro medio.

El AcM 3457 fue el único de los específicos de y que, reconociendo a todos los subtipos ay, no presentó reacción de cruce con ninguno de los ad. El H10C la presentó con adw4, adr_q+ y adr_q-, de forma que el cociente con H95C era menor de 5 para todos ellos. El 4C6 presentó reacción de cruce con los mismos subtipos, reducible hasta niveles aceptables para adw4, pero no para adr, al disminuir la concentración de uso.

En la tabla VI se muestran los resultados obtenidos con el panel de referencia en los ensayos de neutralización e inhibición, para los cuales sólo se utilizaron los AcM de laboratorios ABBOTT.

Tabla V.- Especificidad de los anticuerpos monoclonales

	a				d			y			w	r
	H35C	IDE2	3AD5	4B5	H95C	3423 ^a	M5H7	H10C	3457 ^a	4C6	4111 ^a	313 ^a
ayw1	0.744	0.390	0.785	0.784	0.000	0.018	0.002	0.713	2.000	0.287	2.000	0.060
ayw2	0.796	0.793	1.238	0.795	0.016	0.210	0.021	0.886	2.000	0.620	2.000	0.080
ayw3	0.335	0.213	0.896	0.555	0.000	0.140	0.054	0.713	2.000	0.215	1.360	0.000
ayw4	0.819	0.773	1.010	0.652	0.013	ND ^c	0.015	1.293	ND	0.518	ND	ND
ayr	0.410	0.345	0.976	0.631	0.000	0.200	0.007	1.240	2.000	0.258	0.060	2.000
adw2	0.547	0.456	0.623	0.709	1.208	2.000	0.403	0.077	0.030	0.022	2.000	0.170
adw4	0.427	0.588	1.223	0.707	1.134	1.840	0.408	0.397	0.030	0.272	0.540	0.030
adr q+	0.658	0.769	1.130	0.825	1.136		0.079	0.717		0.261		
adr q-	0.769	0.971	1.346	0.797	1.341		0.043	0.333		0.209		
adyw	0.338	0.386	1.056	0.569	0.461	0.790	0.162	1.185	2.000	0.169	1.720	0.020

^a Resultados bibliográficos (82)

^b No se especifica el determinante q

^c No determinado

Tabla VI

SUBTIPO	Neutralización		Inhibición	
	a H35C	d H95C	d H95C	y H10C
ayw1	87	0	22	74
ayw2	90	0	0	96
ayw3	89	0	10	99
ayw4	96	0	19	97
ayr	98	8	0	97
adw2	92	90	99	10
adw4	95	91	99	24
adrq+	91	75	99	62
adrq-	96	94	99	38
adyw	95	12	89	98

Con el ensayo de inhibición logramos reducir los niveles de cruce del monoclonal H10C lo suficiente como para que adw4 quede clasificado como ad. Sin embargo, adrq- quedaría indeterminado y adrq+ continuaría siendo reactivo para ambos determinantes, de la misma forma que adyw, aunque este último con porcentajes de inhibición sensiblemente mayores. En el trabajo donde se caracterizan originalmente éstos AcM (63) con un panel de referencia similar no se describen estas reacciones de cruce, debido, probablemente, a que los ensayan en un EIA de inhibición logrando abolirlas incluso con los adr. De hecho, ellos también detectaron este problema (Dr. Eloisa Guerrero, com. personal), llevándolos a sustituir el AcM H10C81 por otro más específico en sucesivos trabajos (68).

El ensayo de neutralización permitió una correcta clasificación de todos los subtipos ad, aunque, dado que H10C no funcionó en este tipo de ensayo, la

clasificación como ay sólo puede establecerse por exclusión, aunque adyw hubiera sido erróneamente clasificado como ay siguiendo este criterio. En la práctica, el subtipado por neutralización fue correcto en 113 (97.4%) de las 116 muestras subtipadas también por EIA indirecto, siendo las tres restantes variantes defectivas en ambos determinantes de subtipo (ver apartado d.2) que hubieran sido erróneamente consideradas ay por neutralización. Dado el alto porcentaje de correlación, se admitió el subtipado como ay por exclusión en aquellas muestras cuyo bajo nivel de HBsAg sólo permitió su ensayo por neutralización.

a.1.2 Sensibilidad

En la figura 11 se muestran los resultados obtenidos tras analizar un panel de sensibilidad de HBsAg (Lab. ABBOTT) con los AcM H35C, H10C y H95C por EIA indirecto. La sensibilidad para el determinante a fue de 1.8 ng/ml para el subtipo ay y 3 ng/ml con el subtipo ad, siendo algo más baja para los determinantes de subtipo: 7 ng/ml para ay y 8 ng/ml para ad.

La sensibilidad del ensayo de neutralización viene dada por las propias características del equipo comercial AUSZYME EIA (Lab. ABBOTT) (0.1 ng/ml), superándose incluso, ya que pueden valorarse absorbancias de base inferiores al del valor de corte del ensayo, de acuerdo con las instrucciones de un ensayo de confirmación de la propia casa comercial basado en el mismo principio.

La sensibilidad del ensayo de inhibición no fue ensayada, aunque se estima en unas diez veces menor que la del método indirecto.

a.2 PCR. Comparación con métodos antigénicos

Utilizando las cuatro combinaciones posibles de iniciadores de subtipado, los nueve subtipos pudieron ser clasificados en cuatro grupos diferentes: ayw1/ayw4/ayr, ayw2/ayw3, adw2/adrq+ /adrq-, adw4 (tabla VII). Sin embargo, también se obtuvieron bandas adicionales, aunque de menor intensidad, para ayw2 con la pareja T68/D122 y para adrq+ con T68/Y122. Sólo se amplificaron secuencias ay (ayw2/ayw3) en la muestra adyw, coincidiendo con el determinante d/y de subtipo para el que se obtuvo mayor absorbancia en los inmunoensayos.

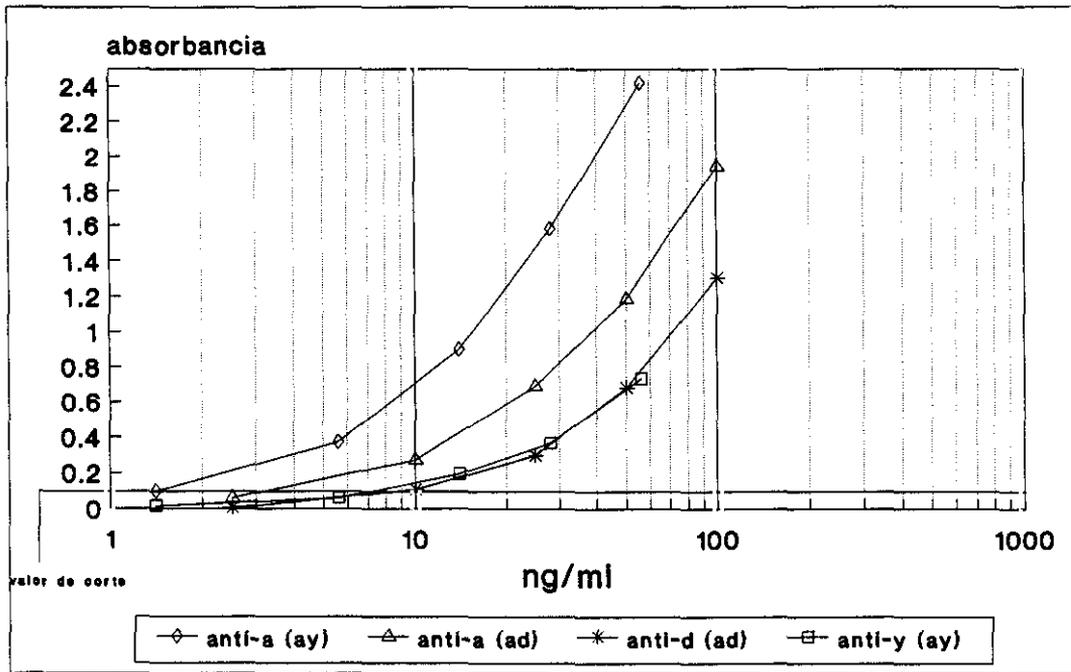


Figura 11.- Reactividad del panel de sensibilidad a HBsAg en EIA indirecto. anti-a- H35C, anti-d - H95C, anti-y - H10C. Se indica entre paréntesis el antígeno empleado.

Tabla VII Especificidad del método de subtipado por PCR

Subtipo	Pareja de iniciadores ^a				Grupo
	T/Y	C/Y	T/D	C/D	
ayw1	+	-	-	-	ayw1/ayw4/ayr
ayw2	-	+	*	-	ayw2/ayw3
ayw3	-	+	-	-	ayw2/ayw3
ayw4	+	-	-	-	ayw1/ayw4/ayr
ayr	+	-	-	-	ayw1/ayw4/ayr
adw2	-	-	+	-	adw2/adr
adw4	-	-	-	+	adw4
adrq+	*	-	+	-	adw2/adr
adrq-	-	-	+	-	adw2/adr
adyw	-	+	-	-	#

^a = T/D=T68/D122, C/Y=C68/Y122, C/D=C68/D122, T/Y=T68/Y122

* = Banda débil

= Solo se detectaron secuencias del grupo ayw2/ayw3.

Además del panel de referencia, se ensayaron 26 muestras (13 ad, 13 ay) previamente subtipadas por EIA indirecto. Todas las ad resultaron ser del grupo adw2/adrq+/adrq-, mientras que todas las ay quedaron encuadradas en ayw2/ayw3. El resultado fue verificado por contraelectroforesis con

antisueros policlonales en nueve de las ad, resultando todas adw2, y en siete ay, siendo todas ayw3 (tabla VIII). En la figura 12 se muestran, a título de ejemplo, los resultados de doce de éstas muestras.

Tabla VIII Resultados obtenidos por PCR en 26 muestras previamente subtipadas por EIA monoclonal.

Antigénico			PCR			
AcM	AsP	N	T/Y	C/Y	T/D	C/D
ay	ayw3	7	-	+	-	-
ay	ND	6	-	+	-	-
ad	adw2	9	-	-	+	-
ad	ND	4	-	-	+	-

EIA=Enzimoimmunoanálisis, AcM=EIA con anticuerpos monoclonales, AsP=Contrainmunolectroforesis con antisueros policlonales, N=Número de muestras, T/Y=T68/Y122, C/Y=C68/Y122, T/D=T68/D122, C/D=C68/D122, ND=No determinado

Ninguno de los métodos de subtipado por PCR descritos previamente fue capaz de detectar todos los subtipos de HBsAg. De acuerdo con nuestros resultados, Norder y colaboradores (85) logran detectar adw2, pero no adw4, con unos iniciadores semejantes a T68/D122. En este trabajo incluyen, además, otra pareja específica de determinante r dependiente de las posiciones 47 y 214, aunque incapaz de amplificar secuencias ayr. En un trabajo posterior (86), estos autores mantienen los reactivos específicos de d, e introducen otros para el determinante y, cuya especificidad estriba sólo en la posición 122, ya que uno de los iniciadores corresponde a una región conservada, así como de determinante w/r

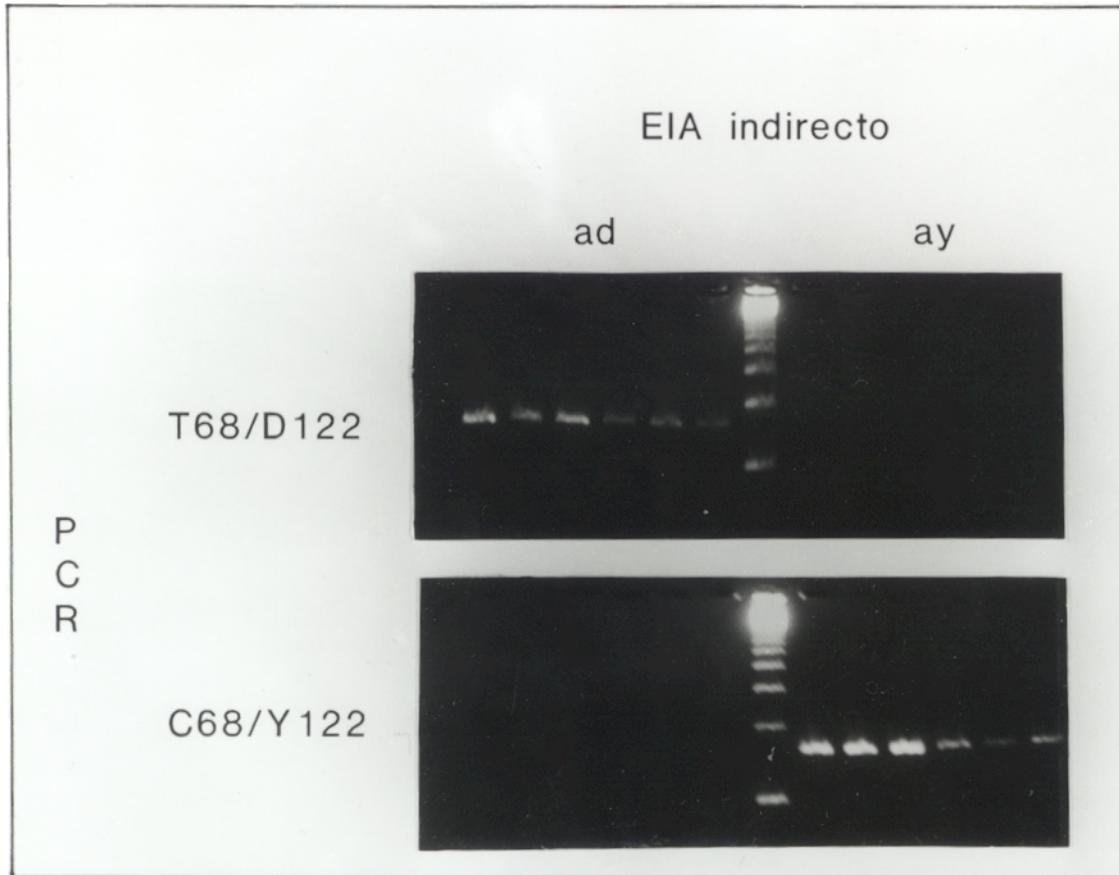


Figura 12: especificidad del ensayo de subtipado por PCR. A título de ejemplo se muestran los resultados obtenidos con seis muestras ad y seis muestras ay previamente subtipadas por EIA indirecto. Los geles correspondientes a las parejas de iniciadores T68/Y122 y C68/D122 no se muestran, ya que no contienen ninguna banda visible.

dependientes, también únicamente, de la posición 160. Con estos reactivos son capaces de detectar todos los miembros del panel, excepto ayr, clasificándolos según los cuatro subtipos fundamentales (adw, ayw, adr). Resulta extraño que no amplifiquen ayr, ni con los iniciadores específicos de y ni con los de r, ya que las posiciones 122 y 160 son fijas en todas las secuencias ayr publicadas hasta el momento. Esto no ocurre, sin embargo, con el residuo 68, en cuya segunda base hibridan nuestros iniciadores C68 y T68, por lo que debemos esperar que las muestras ayr que presenten citidina en lugar de timidina en esta posición caigan en el grupo ayw2/ayw3. Dado que no era esperable la presencia de determinante r en nuestras muestras, no se han empleado iniciadores de determinante w/r.

En un último método de subtipado por PCR descrito por Nicholson y colaboradores (87), sólo se emplea un iniciador específico de y, cuyo extremo 3', sorprendentemente, cae en una posición variable, pero no dependiente de subtipo. En este trabajo no se hace uso de ningún panel de referencia, ensayando solamente muestras de la misma procedencia geográfica, pudiendo ocurrir que las cepas ad y ay que allí circulan se diferencien en esta posición.

Como puede observarse en la tabla VII, sólo se produjo amplificación cuando los extremos 3' de ambos iniciadores hibridaron con la secuencia problema, quedando totalmente abolida cuando uno los dos queda desapareado en esta posición. Sin embargo, la posición adyacente al extremo 3' de los iniciadores es también variable (figura 9), aunque independientemente del subtipo, habiéndose seleccionado citosina para proporcionar un desapareamiento adicional en la mayoría de los casos. Las bandas adicionales observadas en ayw2 y adr_q+ cuando solamente el iniciador 122 está desapareado en 3', podrían deberse a que, quizás, estas muestras no proporcionen el desapareamiento adicional al presentar guanosina en 3'', de forma que el simple desapareamiento T/G o C/A en 3' no sería capaz de prevenir totalmente la amplificación, tal como otros autores han sugerido (181). Sin embargo, estos mismos desapareamientos simples en los iniciadores 68 sí que parecen abolir totalmente la amplificación.

La sensibilidad del método pudo establecerse entre 0.016 y 0.16 pg/ml analizando diluciones de una muestra cuya concentración de ADN de VHB había sido previamente establecida por medio de un ensayo cuantitativo de hibridación

(Genostic, Lab. ABBOTT) (figura 13). Sin embargo, recordemos que las muestras ayw2, adw4 (ambas HBeAg neg.) y ayw3 (HBeAg positiva) del panel original, tuvieron que ser reemplazadas al no presentar ADN de VHB amplificable. En este sentido, ya hemos indicado en la introducción que muchos portadores asintomáticos no presentan ADN viral circulante, por lo que no podrían ser subtipados por PCR, aunque sí por métodos antigénicos. Sin embargo, las técnicas genómicas serían las únicas aplicables para el subtipado de muestras positivas para ADN en ausencia de HBsAg (87). Como vemos, ambas aproximaciones resultan complementarias.

a.3 Rendimiento de los métodos de subtipado.

Las 7 muestras del grupo 1 no provenientes de ninguna de las localidades de estudio (Tabla I), no se incluirán en este análisis, ya que fueron expresamente seleccionadas para este estudio por presentar resultados indeterminados en los métodos de subtipado de barrido. De 670 muestras de portadores convencionales de VHB (grupos 1 y 3) ensayados en EIA indirecto, 591 (88%) pudieron ser directamente subtipadas como ad o ay, quedando 25 (4%) indeterminadas. Las 54 restantes (8%) fueron negativas para todos los AcM, pudiendo ser posteriormente subtipadas por EIA de neutralización. El resto de las técnicas fueron aplicadas solamente sobre las muestras indeterminadas, por lo que se discutirán los resultados en los correspondientes apartados.

Las muestras de VHB2 (grupos 2 y 3) fueron ensayadas directamente por EIA de neutralización, al tratarse de reactividades bajas para HBsAg. De las 18 muestras con reactividades superiores a 2.000 unidades de absorbancia en AUSZYME MONOCLONAL (Lab. ABBOTT) que fueron ensayadas en EIA indirecto, cuatro fueron subtipadas como ay y una quedó como indeterminada al presentar reactividad simultánea para d e y, no siendo las 13 restantes reactivas con ningún AcM al caer bajo los niveles de detección del ensayo.

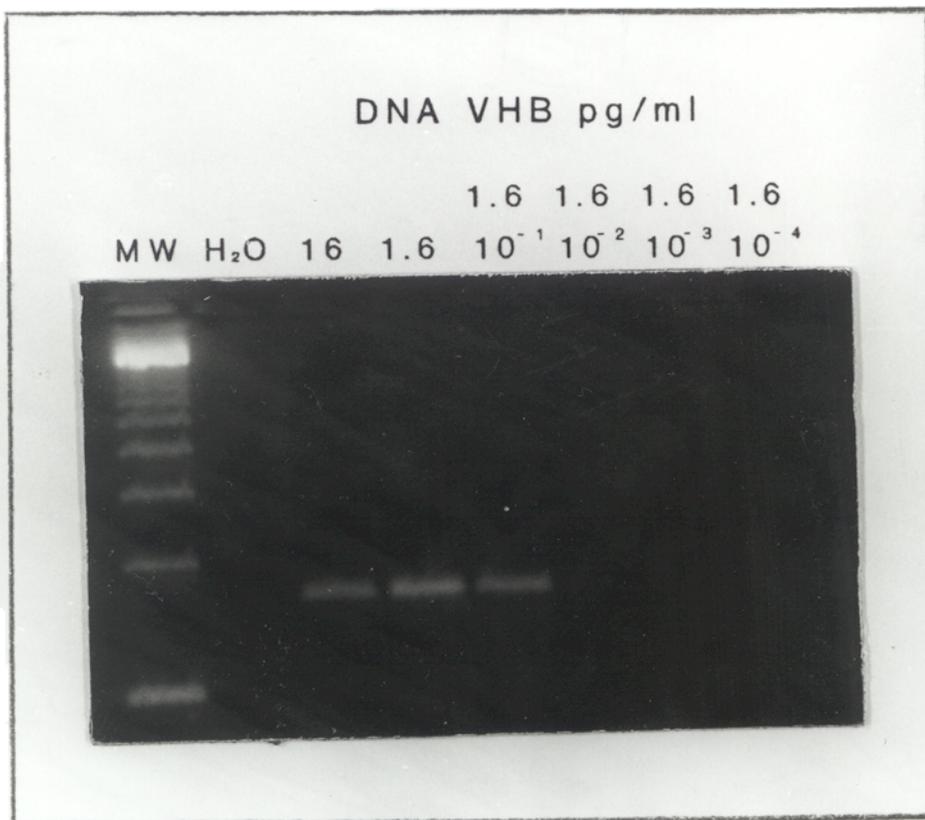


Figura 13: sensibilidad del ensayo de subtipado por PCR. En la figura se muestran los resultados obtenidos al amplificar una serie de diluciones décimas de una muestra del grupo ayw2/ayw3 que contenía 16 pg/ml de DNA de VHB medido por un método cuantitativo de hibridación (ver texto), con la pareja de iniciadores C68/Y122.

B) DISTRIBUCION DE SUBTIPOS ENTRE PORTADORES DE VHB

En este apartado sólo se consideran las muestras totalmente subtipadas como ad o ay, tratándose las indeterminadas en apartados posteriores.

b.1 Distribución geográfica.

Los resultados correspondientes a las muestras del grupo 1 se muestran en la tabla IX. No se observaron diferencias geográficas significativas dentro de los subgrupos b (ADVP) (fig 14.b) y c (otros riesgos) del grupo 1 ($p > 0.545$). Dentro del subgrupo a (pacientes sin riesgo de infección conocido), tampoco se observaron dichas diferencias ($p > 0.108$), excepto en el caso de Navarra, donde la frecuencia del subtipo ay fue mucho más alta que en resto de las poblaciones estudiadas ($p < 0.009$) (fig 14.a). Los pacientes de esta localidad eran donantes de sangre diagnosticados como portadores de HBsAg hace años y que fueron citados para su seguimiento, por lo que la muestra, en principio era muy seleccionada. Además, muchos de ellos pertenecen a una misma zona de Navarra donde la prevalencia de HBsAg es muy elevada respecto al resto de la población, hecho que podría atribuirse a una posible diseminación de la infección, hace muchos años, debido al uso de jeringas no desechables por un determinado sanitario (Dr. Antonio Medarde, com. pers.).

Aunque cabría pensar que la compleja distribución de subtipos descrita en la población de las áreas circundantes a España (94), con un predominio de ay en el Magreb y en Italia y Grecia y de ad en Francia y Centroeuropa (fig 7), se tradujese en diferencias geográficas de distribución de subtipos dentro de nuestro territorio, no las hemos encontrado en ninguno de los grupos de riesgo considerados. Creemos que la gran abundancia del subtipo ay encontrada en los donantes de sangre de Navarra, como única excepción, es debida a las peculiaridades de la muestra correspondiente, especialmente en lo que se refiere a la posibilidad de que muchos de los pacientes hayan sido infectados por la misma fuente. En cualquier caso, el estudio de una muestra no seleccionada de donantes de sangre navarros aclararía esta cuestión.

TABLA IX.- Distribución de subtipos ad y ay en el grupo I

LOCALIDAD	SUBTIPO	Subgrupo a NO RIESGO	Subgrupo b ADVP ^b	Subgrupo c OTROS
MADRID	ad	30(55)	9(19)	15(41)
	ay	25(45)	39(81)	22(59)
ASTURIAS	ad	16(50)	9(17)	20(37)
	ay	16(50)	43(83)	34(63)
ZARAGOZA	ad	12(37)	3(13)	
	ay	20(63)	21(87)	
MALAGA	ad	18(39)	6(23)	
	ay	29(61)	20(77)	
BARCELONA	ad	33(55) ^a	5(21)	
	ay	27(45)	19(79)	
VALLADOLID	ad	15(63)		
	ay	9(37)		
NAVARRA	ad	2(8)		
	ay	24(92)		
SEVILLA	ad	25(54)		
	ay	21(46)		
TOTAL	ad	151(47)	32(18)	35(38)
	ay	171(53)	142(82)	56(62)

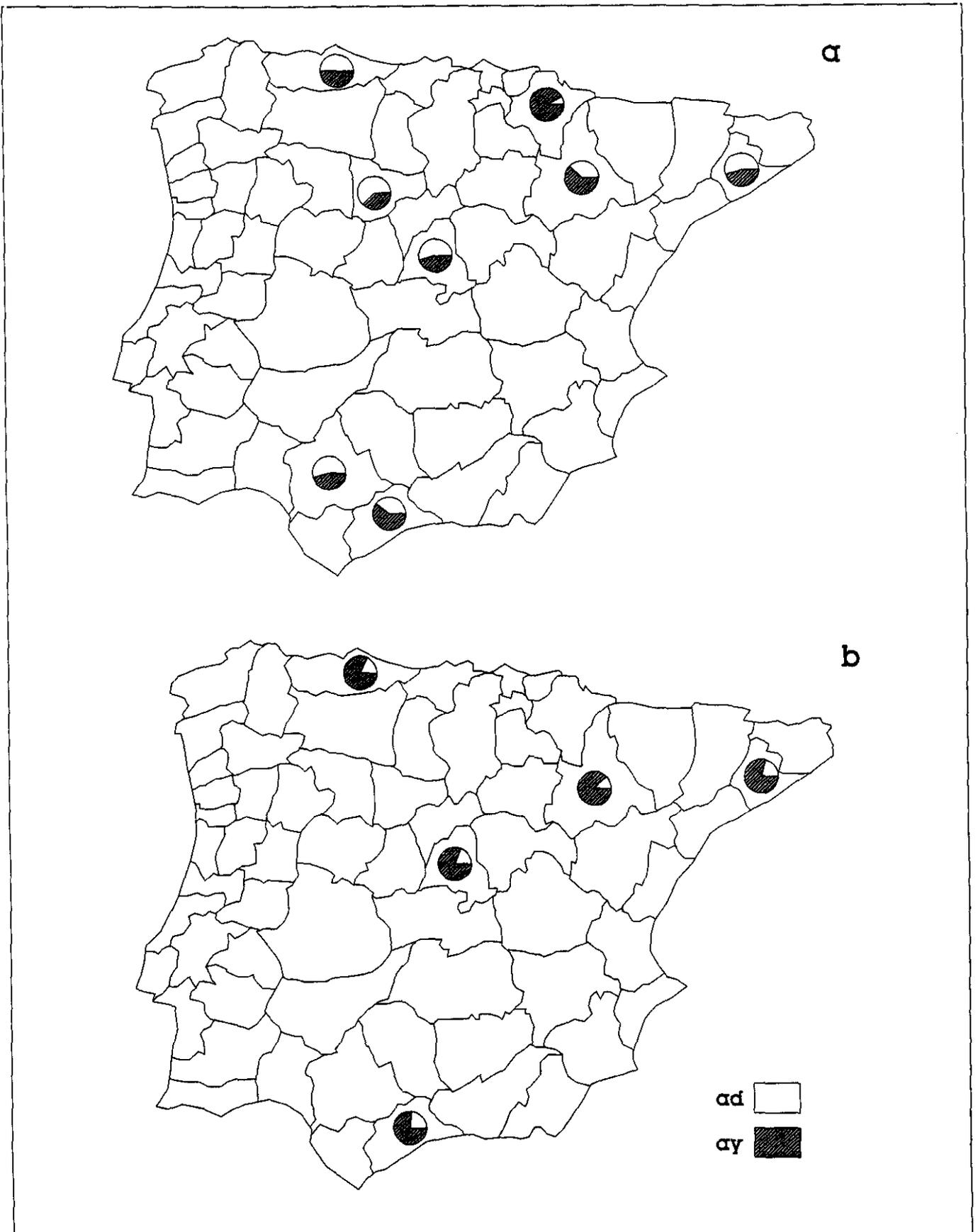


Figura 14: distribución geográfica de subtipos de VHB correspondiente a los pacientes del grupo 1
a: Sin prácticas de riesgo conocidas (subgrupo 1a).
b: adictos a drogas de administración parenteral (subgrupo 1b).

La homogeneidad encontrada dentro de la población general en territorio español, en claro contraste con la compleja distribución descrita en los países circundantes, nos muestra la importancia de las fronteras políticas en la epidemiología de la infección, comportándose como barreras para la circulación del virus, aun cuando éste parece llevar infectando al hombre desde sus albores (91). La semejante presencia de ad y ay que hemos encontrado en la población general parece una síntesis de las tendencias norteafricana y centroeuropea, reflejo, quizás, de la confluencia de ambas culturas durante diferentes períodos de nuestra historia.

El hecho de que dentro del subgrupo 1a se hayan incluido dos tipos de poblaciones diferentes, donantes de sangre (Asturias, Zaragoza, Málaga, Navarra y Sevilla) y pacientes con hepatopatías que no han declarado prácticas de riesgo (Madrid y Valladolid), no parece haber tenido influencia en cuanto a su composición de subtipos de VHB.

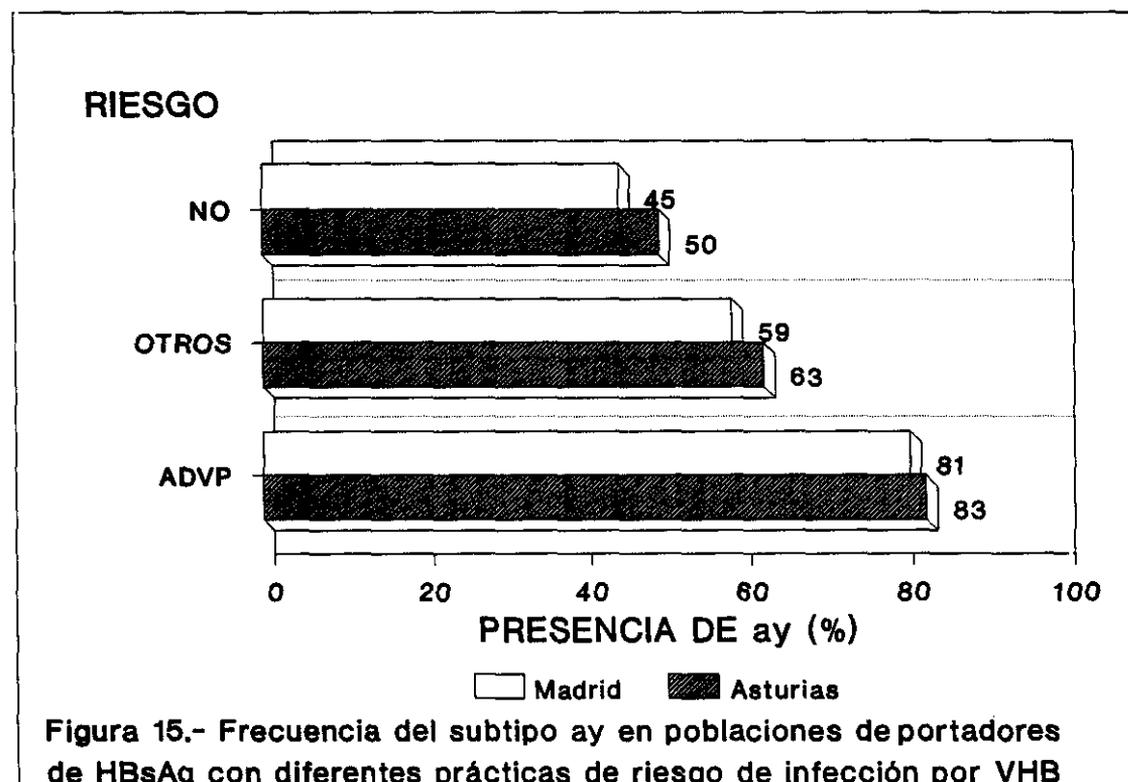
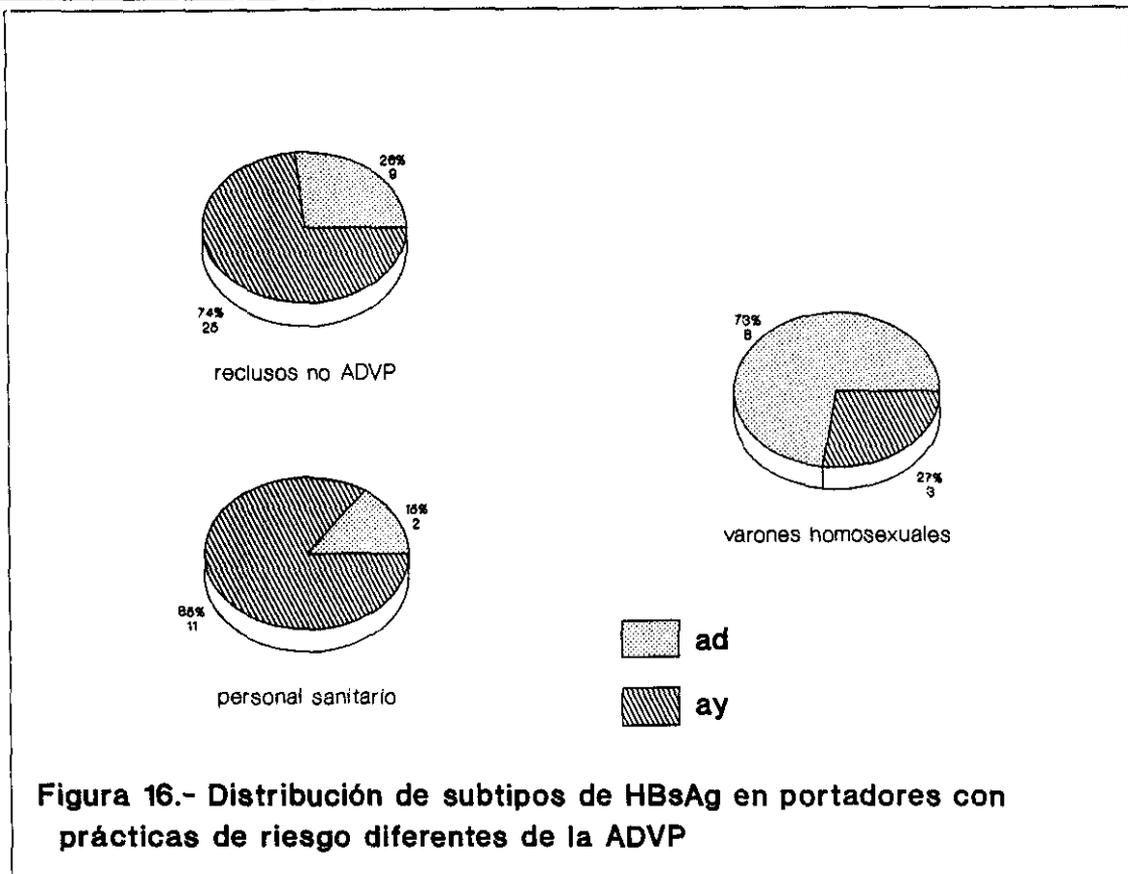
Los resultados por nosotros obtenidos coinciden con los publicados por Pedreira y colaboradores en 1975 (175) para el área de Barcelona. La tendencia al incremento de la prevalencia del subtipo ay encontrada por estos autores a principios de los años 70, como consecuencia de la aparición de la adición a drogas de administración parenteral como fenómeno social (111), no parece haberse mantenido, por tanto, a partir de entonces. En cualquier caso, para aclarar ésta cuestión sería necesario disponer de una muestra similar a la estudiada por dichos autores.

b.2 Distribución de subtipos de HBsAg en diferentes grupos de riesgo.

En todas las poblaciones donde se dispuso de muestra de pacientes sin prácticas de riesgo conocidas y de ADVP, la presencia del subtipo ay fue siempre significativamente mayor ($p < 0.03$) en los últimos. El grado de significación estadística se incrementa considerablemente ($p < 0.0005$) al tener en cuenta las localidades en conjunto, exceptuando Navarra, análisis válido ya que dentro de cada subgrupo no se apreciaron diferencias de distribución significativas, tal y como comentábamos en el apartado anterior. Ya apuntábamos en la introducción que el subtipo ayw ha sido asociado a la adición a ADVP en varios países europeos y norteamericanos, donde el subtipo adw es el más corriente (94,101,

102,103,104,105,106). El subtipo ayw2, predominante en Oriente medio, podría haberse introducido entre los ADVP a través de heroína contaminada. Sin embargo, es ayw3 el que infecta a los ADVP occidentales (94). Las siete muestras ayw que pudieron subtiparse completamente fueron todas ayw3, independientemente de que se tratara de ADVP (dos) o carecieran de riesgos de infección (cinco). Sin embargo, Couroucé y colaboradores (94) encuentran un ayw2 entre cinco de las muestras ayw españolas que estudian, siendo las cuatro restantes ayw3 de acuerdo con nuestros resultados.

Tanto en Madrid como en Asturias, dos únicas localidades donde se estudiaron poblaciones con riesgos diferentes de ADVP (subgrupo 1.c), la abundancia del subtipo ay fue intermedia entre ADVP y población sin riesgo (fig 15), aunque las diferencias sólo fueron significativas al compararlas con los ADVP ($p < 0.05$). La composición de este subgrupo fue muy heterogénea (Tabla II), de forma que solo se han podido considerar por separado a los reclusos no ADVP, personal sanitario y varones homosexuales, al no disponerse de un número suficiente de casos de las poblaciones restantes. Las dos primeras poblaciones presentaron una distribución similar ($X^2 = 0.1746$, $p = 0.6760$), caracterizada por la prevalencia del subtipo ay, mientras que el subtipo ad prevaleció claramente entre los varones homosexuales, diferenciándolos de las dos poblaciones anteriores ($p < 0.0167$) (figura 16). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Swenson y colaboradores en EEUU (84), país donde predomina adw sobre ayw tanto en la población general, como en los varones homosexuales. En nuestro medio, donde la prevalencia de ad en población general es similar a la de ay, podríamos encontrar una asociación significativa de este subtipo con los varones homosexuales, semejante a la existente entre ay y ADVP, aunque para ello sería necesario estudiar un grupo de muestras más numeroso. La elevada presencia del subtipo ay en la población de reclusos no ADVP, puede ser debida a la convivencia de éstos con ADVP, extremadamente frecuente en las prisiones. Este mismo hallazgo en el personal sanitario puede achacarse al reciente incremento de los ingresos de ADVP en los centros sanitarios, viéndose aumentadas las posibilidades de infección por el subtipo ay. Al igual que en los subgrupos a y b, la distribución



de subtipos fue similar en las dos localidades estudiadas ($X^2=0.013$, $p=0.905$) (figura 15), pese a que la composición del grupo presenta diferencias apreciables entre ambas localidades (Tabla II).

En consecuencia, existen pautas de circulación viral diferentes para los ADVP, entre quienes la transmisión se produce mayoritariamente por vía parenteral, y la población general, donde se produce por otras vías, manteniéndose ciclos epidemiológicos diferentes y escasamente relacionados, conservando cada una de las poblaciones una distribución de subtipos de HBsAg particular. Este fenómeno podría darse en otras poblaciones con vías de transmisión particulares, como los varones homosexuales, aunque no disponemos de datos suficientes que lo apoyen. La distribución de subtipos de HBsAg en un área geográfica determinada es, pues, bastante compleja, pudiendo variar según las poblaciones consideradas. En este sentido, los estudios de distribución geográfica de subtipos de VHB, deben basarse en poblaciones homogéneas. El uso de los subtipos de VHB como herramienta epidemiológica en estudios de transmisión, debe, igualmente, apoyarse en estudios previos sobre las diferentes pautas de circulación del virus en la población.

b.3 Distribución en comunidades cerradas (grupo 3)

En este apartado discutiremos únicamente los resultados correspondientes a los portadores de HBV con patrones serológicos normales, dejando la discusión de los casos de HBV2 para apartados posteriores.

La distribución obtenida entre los reclusos no ADVP internados en la misma prisión (subgrupo 3.b), es similar a la encontrada entre los reclusos del grupo 1 (figura 16), provenientes de diversos penales, con una presencia del subtipo ay del 73% (8 de 11 casos), siendo ad los tres restantes. Parece, pues, que los reclusos se comportan como una población homogénea con una presencia de ay algo mayor que la de la población general, debido, quizás, a la estrecha convivencia con ADVP en el interior de las prisiones, tal como indicábamos en el apartado anterior.

En la tabla X se muestran los resultados obtenidos en las diferentes instituciones para disminuidos psíquicos.

Los resultados son diferentes en cada una de ellas, aun dentro de la misma provincia. Así, a modo de ejemplo, las tres instituciones de la provincia de

Valladolid mostraron resultados diferentes, siendo ay exclusivo en una de ellas, ad en otra, y coexistiendo ambos en la tercera. Llama la atención la ausencia de ay en Palencia 2 pese a haber un número elevado de portadores, así como la presencia

Tabla X: Distribución de subtipos dentro de instituciones para disminuidos psíquicos (subgrupo 3.b). Los casos de HBV2 no se incluyen

Provincia	Institución	ad	ay	Ind @	Total
Madrid	1	4	7	0	11
	2	3	4	0	7
Segovia	1	6	1	0	7
	2	0	0	1	1
	3	0	0	1	1
Palencia	1	24	5	0	29
	2	30	0	0	30
	3	0	2	0	2
	4	5	4	0	9
Zamora	1	0	0	3	3
	2	1	0	0	1
Valladolid	1	2	2	1	5
	2	7	0	0	7
	3	0	2	0	2
Total		82	27	5	114

@= Resultado indeterminado (positivo para d e y simultáneamente)

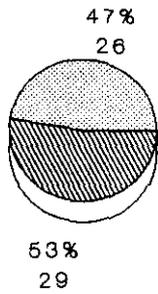
exclusiva de muestras indeterminadas, positivas para ad y ay simultáneamente, en dos instituciones diferentes (Segovia 3 y Zamora 1). Este último hecho será discutido con posterioridad en el apartado de muestras con resultados indeterminados.

Cada una de las instituciones conserva una circulación viral particular, independiente de la de la población general. La mayoría de los pacientes parecen infectarse preferentemente en el interior de las instituciones, sin que se importen casos con frecuencia, a tenor de lo observado en algunos centros donde, a pesar de presentar numerosos casos, todos ellos están infectados por el mismo subtipo.

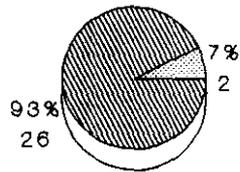
b.4 Subtipos y marcadores de replicación vírica

El único marcador indicativo de replicación vírica activa disponible en un número suficientemente elevado de muestras fue el HBeAg. A fin de interpretar correctamente la distribución de subtipos entre las muestras positivas o negativas para este antígeno fueron estudiados por separado grupos homogéneos, tanto en lo referente a la distribución de subtipos como al grado de presencia de HBeAg. En la figura 17 se muestra la abundancia de HBeAg en cada uno de los subgrupos del grupo 1. No se dispuso de datos de las muestras de Málaga, Valladolid y Sevilla dentro del subgrupo a, ni de las de Barcelona dentro de subgrupo b. Los pacientes con hepatopatías pero sin riesgos de infección conocidos procedentes de Madrid, mostraron una presencia de HBeAg muy superior a la de las otras localidades del subgrupo a ($p < 0.0005$), todas ellas representadas por donantes de sangre, asintomáticos en su mayoría. Estos últimos fueron excluidos del análisis estadístico reflejado en la figura 18 dada la reducida frecuencia de HBeAg, encontrado únicamente en tres casos. La presencia de HBeAg fue estadísticamente similar en todas las localidades de los subgrupos b y c ($p > 0.146$), considerándose, no obstante, cada subgrupo de forma separada debido a sus diferentes distribuciones de subtipos. La mayor presencia de HBeAg encontrada en las muestras del subgrupo a procedentes de Madrid, al compararlas con las de los subgrupos b y c ($p < 0.05$), fue debida, probablemente, a que muchos de los pacientes de los subgrupos b y c acudieron a los centros sanitarios por problemas no relacionados con su condición de portadores de HBsAg, siendo investigados los marcadores de

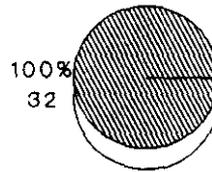
Subgrupo a: sin riesgos conocidos



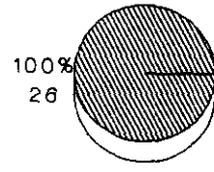
Madrid



Asturias

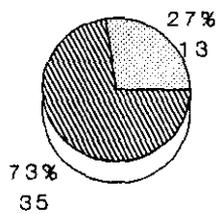


Zaragoza

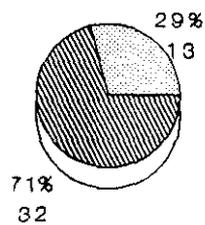


Navarra

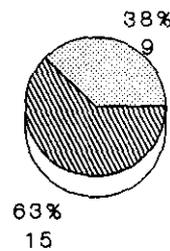
Subgrupo b: toxicómanos



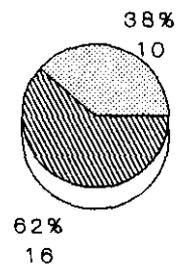
Madrid



Asturias

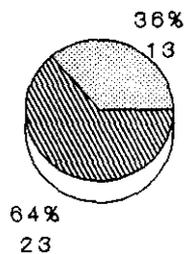


Zaragoza

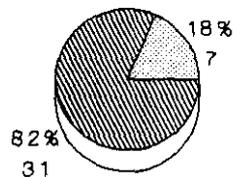


Malaga

Subgrupo c: con otros riesgos



Madrid



Asturias

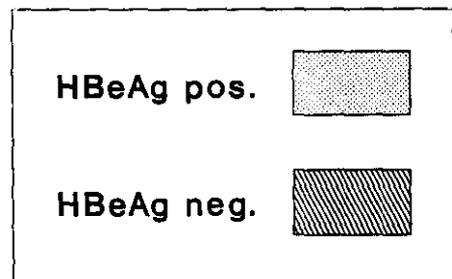


Figura 17.- Presencia de HBeAg en los casos del grupo 1

infección por VHB debido a la existencia de factores de riesgo.

La distribución de subtipos fue estadísticamente independiente de la presencia de HBeAg en todas los grupos estudiados (figura 18), aunque el HBeAg fue siempre algo más abundante entre las muestras del subtipo ad. Al hacer el mismo estudio en el conjunto del subgrupo 3.b (deficientes mentales internados en instituciones especiales), también se observó una distribución similar entre muestras positivas (88% ad, 12% ay) o negativas (80% ad, 20% ay) para HBeAg ($p = 0.6244$), con una presencia ligeramente superior del subtipo ad en las primeras. La compleja distribución de subtipos en este grupo que antes mostrábamos, obligaría a fraccionarlo en exceso para poder analizar grupos homogéneos de muestras, razón por la cual no ha sido realizado dicho estudio. De la misma forma, el grupo de once muestras de reclusos internados en la misma prisión (subgrupo 3.a), con solo dos muestras con HBeAg, resultó demasiado pequeño para estos fines.

Nuestros resultados contrastan de forma patente con los obtenidos por Nath y colaboradores en 1978 (115), los cuales, al estudiar 1370 donantes de sangre de Estados Unidos encontraron una presencia significativamente mayor del subtipo ay entre los positivos para HBeAg (72% ad, 28% ay en HBeAg +; 90% ad, 10% ay en HBeAg -; $X^2 = 52,8$. $p < 0.0005$). Estos datos respaldaban la idea sugerida en otros trabajos, donde se comparaba la distribución de subtipos entre pacientes con distinto grado de deterioro hepático, de que el subtipo ay es más patógeno, cursando su infección con una sintomatología más severa (104, 106, 110). Sin embargo, otros estudios desmintieron tal relación (109, 113, 114), atribuyéndola a la, por entonces, reciente introducción del subtipo ay de la mano de los ADVP, de forma que este prevalecía en los casos de hepatitis aguda y en los portadores más recientes, en contraste con los pacientes infectados años atrás, cuando el subtipo ay era mucho más raro en las áreas estudiadas. Si, en efecto, los portadores del subtipo ay estudiados por Nath y colaboradores (115) llevaran menos tiempo infectados que los del subtipo ad en el momento del estudio, el porcentaje de seroconversiones sería menor, explicando la mayor presencia de HBeAg en aquellos infectados por el subtipo ay. Por otra parte, la distribución de los subtipos ad y ay no es homogénea dentro de EEUU (95), pudiendo esta

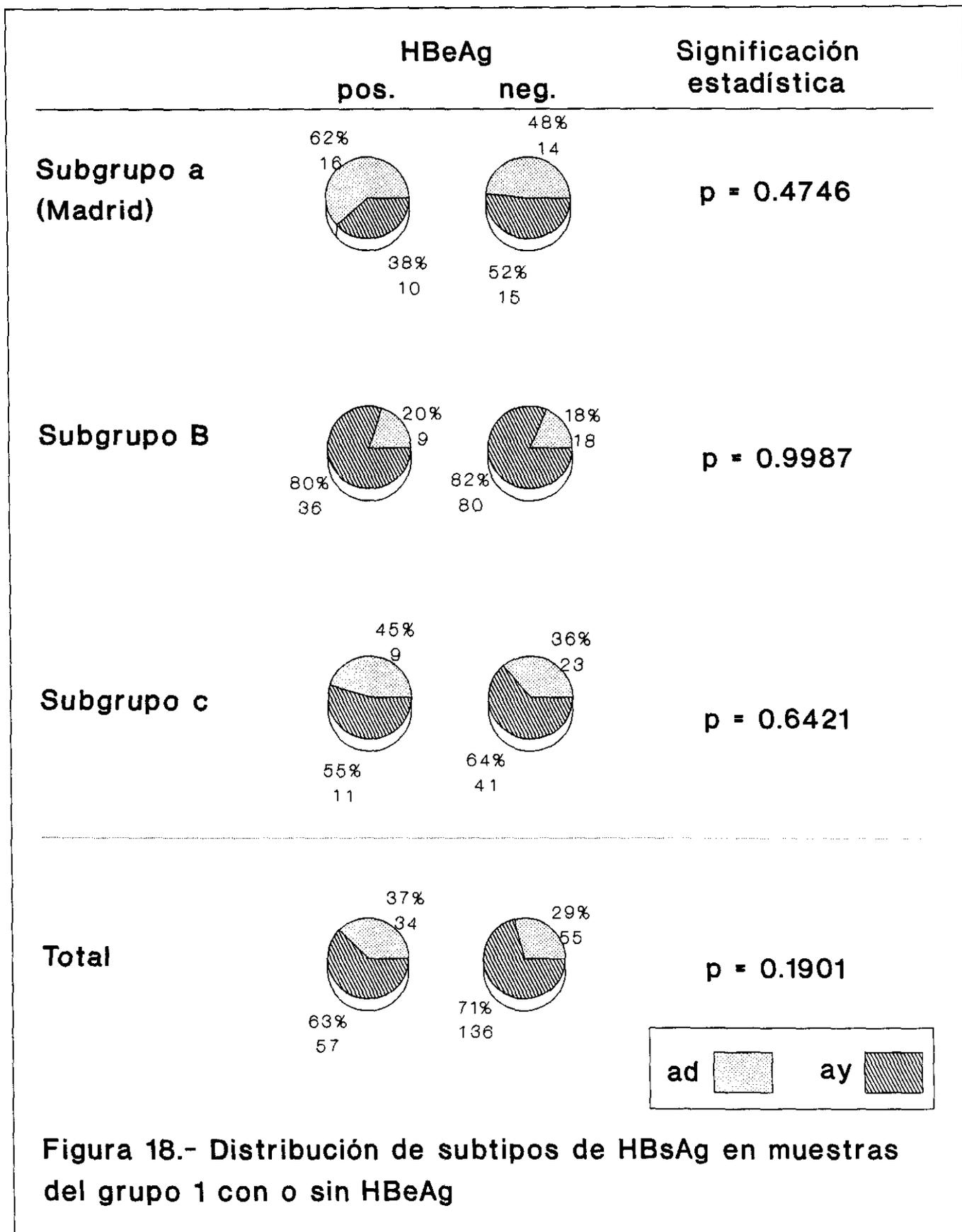


Figura 18.- Distribución de subtipos de HBsAg en muestras del grupo 1 con o sin HBeAg

circunstancia haber causado algún tipo de artefacto en el estudio. Sin embargo, las conclusiones de Norkrans y colaboradores en Suecia (182) son acordes con las nuestras, habiendo encontrado ambos subtipos distribuidos de igual forma en 90 muestras de pacientes con hepatitis B aguda tomadas durante los primeros diez días de evolución. Este grupo de pacientes, sin embargo, no resulta muy adecuado, ya que la presencia o ausencia de HBeAg en los primeros días del período agudo apenas tiene significación clínica, dependiendo fundamentalmente de la celeridad con que la infección evolucione en cada caso.

Nuestros resultados, pues, no apoyan la existencia de diferente grado de patogenicidad entre los subtipos ad (adw) y ay (ayw) sugerida en algunos trabajos previos. Los subtipos de HBsAg no parecen ser, pues, de utilidad en el establecimiento de pronósticos y toma de decisiones terapéuticas.

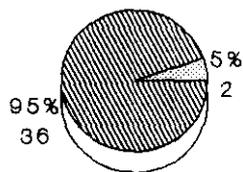
b.5 Subtipos e infección por VHD

El objeto de este apartado es determinar si el VHD es complementado con mayor eficacia por alguno de los subtipos detectados. Se trata de comparar las frecuencias con que el VHD infecta a cada uno de ellos, expresadas como prevalencias de anticuerpos totales anti-VHD.

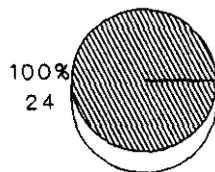
De acuerdo con los resultados publicados (León et al. 1988)), la infección por VHD fue mucho más frecuente entre los ADVP (figura 19) que entre la población sin riesgos conocidos ($p < 0.0001$), mostrando el subgrupo c una situación intermedia pero estadísticamente diferente de la de ambos ($p < 0.0039$), hecho atribuible a la presencia de ADVP no declarados en este último subgrupo, ya que las vías de transmisión no parenterales no parecen muy eficaces para este agente (183). Dentro de cada subgrupo la distribución fue estadísticamente homogénea ($p > 0.2817$), pudiendo, por tanto, ser considerados en conjunto. Sin embargo, el subgrupo 1a fue suprimido del estudio estadístico ya que sólo contenía tres muestras positivas para anti-HDV.

La distribución de subtipos fue independiente de la presencia de anticuerpos anti-HDV tanto en el subgrupo 1b como 1c (figura 20). Cuando se consideran en conjunto los resultados de ambos grupos la independencia persiste. Sin embargo, al incluir las muestras del subgrupo 1a se encuentra una asociación

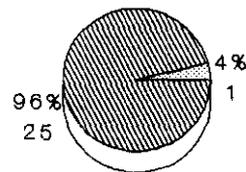
Subgrupo a: sin riesgos conocidos



Madrid

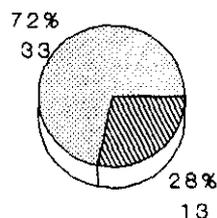


Asturias

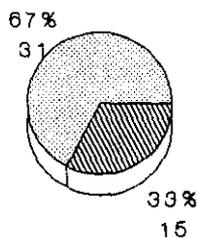


Navarra

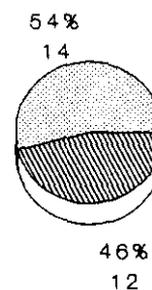
Subgrupo b: toxicómanos



Madrid

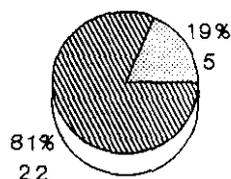


Asturias

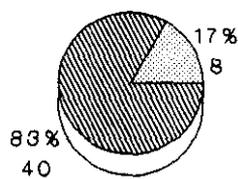


Málaga

Subgrupo c: con otros riesgos



Madrid



Asturias

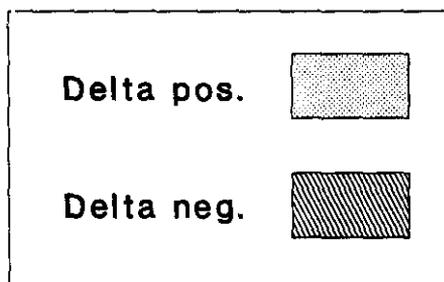
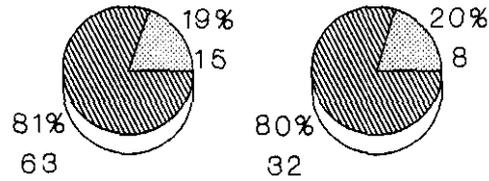


Figura 19.- Presencia de anticuerpos anti-delta en los casos del grupo 1.

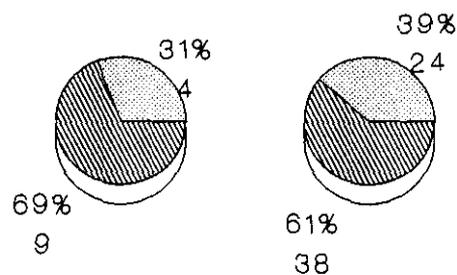
	anti-delta total pos.	neg.	Significación estadística
--	--------------------------	------	------------------------------

Subgrupo b



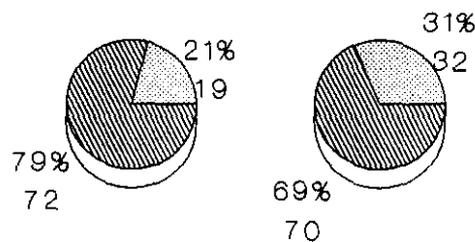
p = 1.0000

Subgrupo c



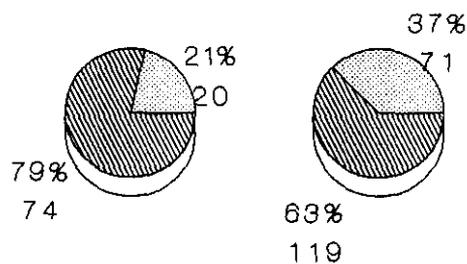
p = 0.8236

Total



p = 0.1370

Total
(con subgrupo a)



p = 0.0093



Figura 20.- Distribución de subtipos de HBsAg en muestras del grupo 1 con o sin anticuerpos anti-delta.

estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre la presencia de anti-HDV y el subtipo ay, como consecuencia del artefacto producido por el hecho de que ambos se encuentran con más frecuencia en los ADVP. Éstos, mayoritariamente ay, se acumulan en el grupo de los anti-HDV positivos, mientras que los otros dos, con mayor proporción de ad, caen mayoritariamente dentro de los negativos, llevando a conclusiones erróneas.

Parece, pues, que el VHD infecta con la misma eficacia a portadores de HBsAg del subtipo ad o ay, hecho no documentado previamente. La frecuencia ligeramente mayor del subtipo ay encontrada en los pacientes anti-HDV positivos del subgrupo c, al compararlos con los negativos, parece apoyar la idea que antes apuntábamos, de que este subgrupo contiene ADVP no declarados. Por otra parte, los resultados obtenidos recalcan la importancia de basar el empleo de los subtipos de HBsAg en el conocimiento previo de su distribución en la población.

C) SUBTIPOS Y VIRUS DE LA HEPATITIS B TIPO 2

Iniciaremos este apartado recordando, una vez más, que el término HBV2 se usa, en aras de una exposición más agil, para referirnos a las muestras con patrones atípicos de marcadores de infección seleccionadas según los criterios expuestos en el apartado a.2 de materiales y métodos. En ningún caso se pretende, pues, afirmar la existencia de un nuevo tipo del VHB. Los resultados correspondientes a las muestras de HBV2 del grupo 2 figuran en la tabla XI. El 74% de ellas fue clasificada como ad en el ensayo de neutralización, mientras que el 26% restante no fue reconocida por el AcM anti-d, siendo clasificadas como ay por exclusión, tal como indicamos en apartados precedentes. Este subtipado por exclusión pudo comprobarse en cuatro de ellas que presentaron niveles de reactividad detectables en el ensayo indirecto, siendo reconocidas por el AcM anti-y. La única muestra clasificada como ad por EIA de neutralización que pudo ser detectada en el EIA indirecto resultó indeterminada, al ser reconocida por ambos AcM de subtipo.

Tabla XI: subtipos de HBsAg en los casos de HBV2

	Subtipo	
	ad	ay
Grupo 2		
a. Sin riesgo	51 (80)	13 (20)
b. Toxicómanos	2 (22)	7 (78)
c. Otros riesgos	13 (62)	8 (38)
Grupo 3		
a. Reclusos	6 (60)	4 (40)
b. Deficientes mentales		
* Centro Madrid 1	16 (100)	-
* Centro Palencia 4	5 (83)	1 (17)
Total	93 (74)	33 (26)

Al comparar entre sí las tres poblaciones de riesgo del grupo 2 (figura 21.a) se puede apreciar como, de manera análoga a los portadores de HBsAg del grupo 1, el subtipo ay es más frecuente entre los ADVP que entre la población normal ($p=0.0012$), presentando los del subgrupo c una situación intermedia. No se dispuso de suficientes muestras de este último subgrupo como para considerar poblaciones de riesgo por separado, tal como hicimos con los reclusos, varones homosexuales y personal sanitario del grupo 1.

El subtipo ad fue siempre más frecuente en los casos de HBV2 que en los de portadores de HBsAg en todas las poblaciones para las que se dispuso de ambos tipos de casos (figura 21), aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso de la población sin riesgos del grupo 1 ($p=0.0062$) y en la institución Madrid 1 del grupo 3.b ($p=0.0039$). Esta falta de

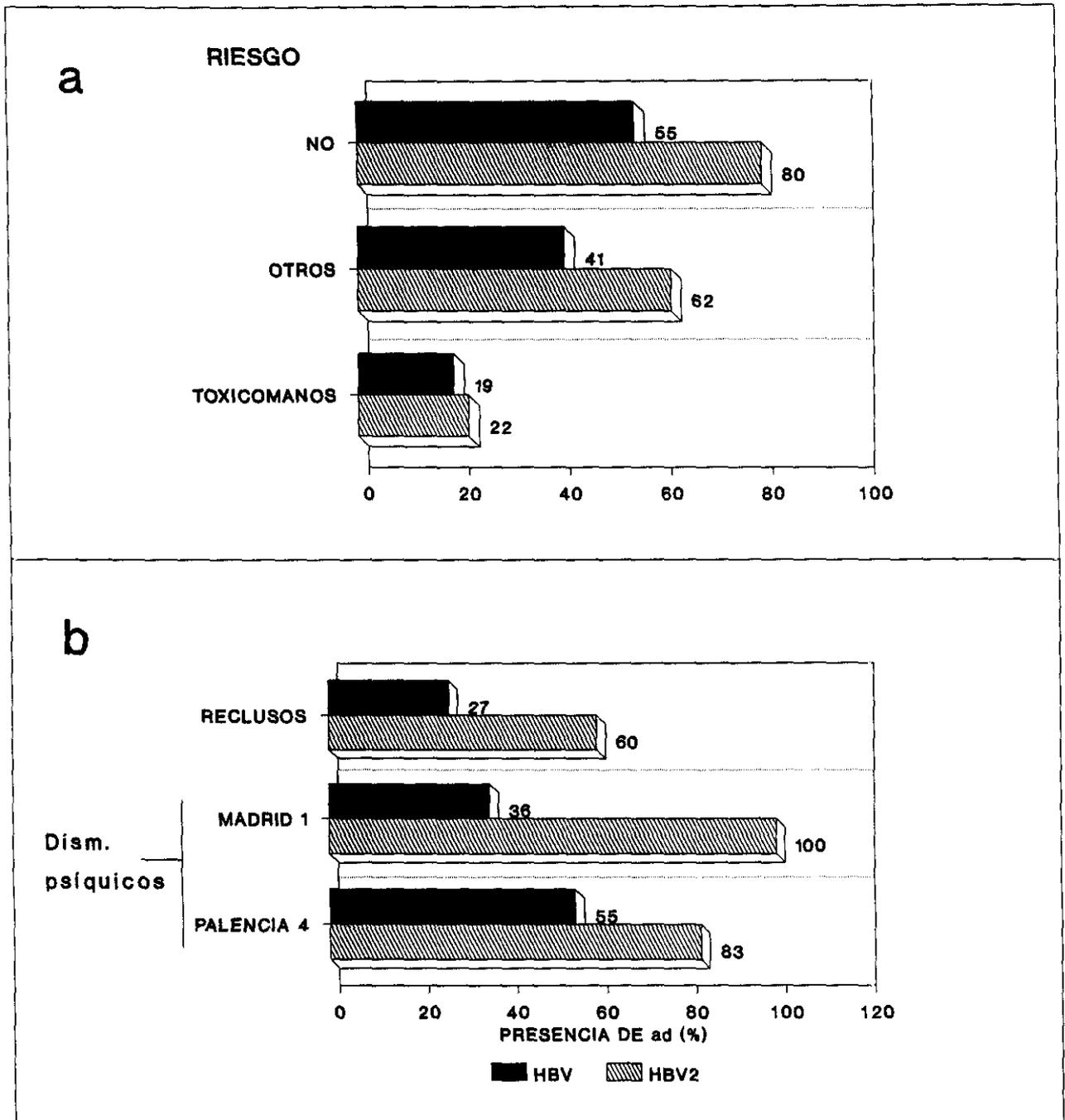


Figura 21.- Distribución de subtipos de HBsAg en casos de HBV2.

a: comparación de los grupos 1 (HBV) y 2 (HBV2) en Madrid.

b: comunidades cerradas (grupo 3) con casos de HBV2.

respaldo estadístico en el resto de los grupos podemos achacarlo al escaso número de muestras, habida cuenta de las importantes diferencias de porcentajes, excepto en el caso de los ADVP, cuyos porcentajes de presencia de ad son prácticamente similares en portadores de HBsAg convencionales y HBV2.

Se han propuesto diferentes hipótesis sobre el agente etiológico implicado en este tipo de casos. La presencia de distintos epítomos de subtipo, a, d e y, aquí demostrada apunta hacia el propio HBV, o una variante muy relacionada, apoyando hallazgos previamente descritos como la capacidad de neutralización de los anticuerpos anti-HBs policlonales (138, 145, 146), la presencia de ADN de VHB en un porcentaje de este tipo de muestras (144, 146), o la visualización de partículas similares a HBsAg por microscopía electrónica (138). En cualquier caso, la especificidad de la reacción resulta indudable.

La falta de protección de los anticuerpos anti-HBs generados tras la infección natural por VHB o la vacunación, observada en estudios previos (138, 146, 147) y en algunas de nuestras muestras, contrasta con la expresión aparentemente normal del determinante común, a tenor de su reactividad tanto con anti-HBs policlona, como con el AcM anti-a H35C.

La distinta distribución encontrada dentro de poblaciones con diferentes prácticas de riesgo de infección por VHB que conviven en la misma localidad sugiere que, al igual que el VHB en los casos del grupo 1, el agente implicado circularía de forma independiente en cada una de ellas, ligado, probablemente, a vías de transmisión particulares. Por otra parte, hemos visto que el subtipo ad fue siempre más abundante entre los casos de VHB2 que entre los portadores convencionales de VHB, excepto en el caso de los ADVP, para los que esta diferencia fue prácticamente inexistente. Estos resultados sugieren que el VHB y el agente presente en los casos de VHB2 únicamente compartirían la vía parenteral como principal modo de transmisión en los ADVP, transmitiéndose por medios diferentes en la población general. En este sentido, se ha sugerido que el VHB2 podría transmitirse oralmente, habiendo sido puesta de manifiesto, con elevada frecuencia, su circulación conjunta con agentes como el VHA, que usan habitualmente esta vía (146). El VHB2 podría tratarse, pues, de una variante de VHB con capacidad para transmitirse por vía oral produciendo infecciones leves e

incluso silentes. Una vez producida la mutación responsable, la expresión del determinante d podría ser más favorable a la vía de transmisión oral que la del determinante y, exponiendo, quizás, una configuración más adecuada para estos fines. Así, aunque las variaciones se producirían con igual frecuencia en ambos subtipos, las partículas ad circularían más fácilmente debido a su mayor transmisibilidad, traduciéndose en un incremento de su frecuencia relativa con respecto a ay. Esta selección de variantes ad no se produciría cuando la vía de transmisión fuera otra diferente de la oral, como en el caso de los ADVP, manteniéndose las proporciones de ambos subtipos en los mismos términos que en los casos convencionales. Este modelo presupone, pues, la existencia de una mutación, o mutaciones, que afecten tanto a su transmisibilidad, favoreciendo la vía oral, como a su patogenicidad, produciendo síntomas más leves, como a su expresión antigénica, permitiéndoles infectar en presencia de anticuerpos específicos para VHB. La ausencia de respuesta inmune posterior a la infección podría explicarse por dichas alteraciones antigénicas, viéndose favorecida por las propias características de la vía de transmisión oral. Recientemente, se han detectado mutantes naturales del HBV que presentan deleciones importantes en el gen X, que codifica para el transactivador de transcripción del genoma viral (136). El efecto esperado de dichas deleciones sería la síntesis de un HBxAg no funcional, incapaz de ejercer como transactivador de transcripción. Los pacientes infectados sufrieron episodios de elevación discreta de los niveles de transaminasas en suero, sin que fuera posible detectar en ellos antigenemia (HBsAg, HBeAg) ni respuesta de anticuerpos frente a componentes estructurales (anti-HBc, anti-HBs). Además algunos de ellos fueron posteriormente reinfectados con éxito por cepas salvajes de VHB, indicando así que los mutantes encontrados no indujeron inmunidad a la reinfección. Así, parece posible que la infección por mutantes incapaces de sintetizar un HBxAg funcional daría lugar a una muy baja replicación viral, insuficiente para provocar una respuesta de anticuerpos suficiente para generar inmunidad, situación que presenta claras similitudes con algunos de los hallazgos típicos de la infección por VHB2. Por lo tanto, es posible que exista alguna relación entre el fenómeno VHB2 y la infección por mutantes defectivos en la síntesis de un HBxAg funcional. En cualquier caso, el conocimiento de la

secuencia completa de estas variantes debe dar la clave para la resolución de estas cuestiones.

D) SUBTIPOS ANOMALOS

d.1 Coexistencia de determinantes de subtipo.

d.1.1 Discriminación de grupos

Veintitrés de las muestras estudiadas quedaron indeterminadas tras ser ensayadas en EIA indirecto con los AcM de subtipo H95C (anti-d) y H10C (anti-y), por presentar reactividad simultánea para ambos, siendo la razón entre la absorbancia mayor y la menor inferior a 5 (Tabla XII). En todos los casos excepto Z29 la absorbancia obtenida con el AcM anti-d fue mayor que la correspondiente al anti-y. La doble reactividad con los AcM de subtipo podría haber sido, pues causada, bien por la presencia de un subtipo ad de los que cruzan con el AcM H10C (adw4, adr, tabla V), bien por una verdadera coexistencia de determinantes de subtipo, como en el caso de la muestra adyw del panel de referencia empleado en la puesta a punto de los métodos. La primera posibilidad se excluyó en la muestra Z29, al presentar, al igual que la muestra adyw del panel de referencia, mayor absorbancia con el AcM anti-y que con el anti-d.

El EIA de inhibición redujo a tan solo siete el número de muestras indeterminadas (% inhibición superior a 40 con ambos AcM), aunque otras cuatro no pudieron ser ensayados por no disponerse de suficiente volumen de muestra.

Estas siete muestras fueron caracterizadas, siempre que fue posible, con el resto de los AcM en EIA indirecto, con antisueros policlonales en contraelectroforesis y por PCR (tabla XIII).

Todas ellas fueron reconocidas por otros dos AcM específicos de determinante d, aunque Z29 no lo fue por el AcM M5H7 debido, probablemente a un problema de sensibilidad de la técnica, ya que se trata de la muestra para la que se obtuvo menor señal con los otros AcM. El AcM 4C6 (anti-y) se comportó como el H10C reaccionando con todas las muestras. Sin embargo, el AcM 3457 no

Tabla XII: Muestras con coexistencia de determinantes de subtipo

MUESTRA	EIA indirecto			EIA Inhibición	
	d H95C	y H10C	RAZ	d H95C	y H10C
32	1.405	0.563	2.5	99	24
179	1.139	0.476	2.4	ND	ND
342	1.508	0.616	2.4	ND	ND
413	1.143	0.337	3.4	99	41
490	2.400	0.493	4.9	99	12
604	1.002	0.535	1.9	99	25
1353	0.698	0.146	4.8	98	23
B51H	1.597	0.691	2.3	99	59
2015	1.101	0.422	2.6	ND	ND
2021	1.216	0.318	3.8	99	14
A858	1.339	0.539	2.5	99	38
A1101	1.211	0.375	3.2	99	29
OB4	0.898	0.491	1.8	99	52
Z20	1.138	0.455	2.5	98	55
D12	1.503	0.649	2.3	99	26
E18	0.636	0.284	2.2	ND	ND
S82	0.557	0.202	2.8	98	12
S99	1.522	0.501	3.0	99	40
S100	1.551	0.499	3.1	99	38
S101	1.064	0.306	3.5	98	32
S106	1.572	0.498	3.2	99	26
O27	0.976	0.345	2.8	97	76
Z29	0.614	0.906	1.5	97	93

Raz = cociente (mayor/menor) entre las absorbancias obtenidas con los AcM H95C y H10C. Los valores de EIA indirecto corresponden a unidades de absorbancia, mientras que los de EIA de inhibición son porcentajes de inhibición. Los casos en negrita permanecieron indeterminados incluso en EIA de inhibición.

CASO	EIA indirecto								AsP	PCR
	d			y			w	r		
	H95C	3423	M5H7	H10C	3457	4C6	4111	313		
413	1.143	0.250	0.305	0.337	0.046	0.286	1.387	0.060	NEG	adw4
851H	1.597	0.491	0.254	0.691	0.037	0.278	1.033	0.077	adw4	adw4
O84	0.898	0.573	0.100	0.491	0.046	0.278	3.000	0.082	NEG	NEG
Z20	1.138	ND	ND	0.455	ND	ND	ND	ND	NEG	adw4
S99	1.522	0.203	0.451	0.501	0.041	0.277	1.717	0.053	NEG	NEG
O27	0.976	0.509	0.090	0.345	0.561	0.159	0.609	1.153	NEG	adw2/adr
Z29	0.614	0.322	0.029	0.906	2.733	0.462	2.332	0.053	NEG	ayw2/3

Tabla XIII.- Caracterización de las muestras reactivas simultáneamente para los determinantes d e y.

Asp: Contrainmunolectroforesis con antisueros policlonales de referencia.

ND: No determinado.

NEG: Negativo

reconoció a cinco de ellas, aunque sí las dos restantes (O27, Z29). Tres de las cinco muestras no reactivas con 3457 pudieron ser subtipadas como adw4 por PCR, pudiendo ser comprobado el resultado mediante antisueros policlonales de referencia en una de ellas (851H). La muestra adw4 del panel de referencia de subtipos se comportó de la misma manera (tabla V), mostrando reacción de cruce con H10C y 4C6 pero no con 3457.

Las muestras O27 y Z29 fueron, sin embargo, reconocidas por el AcM 3457, conteniendo, además, genomas de subtipos de los que no presentan reacciones de cruce con AcM de especificidad heteróloga, al igual que la muestra de subtipo mixto (adyw) del panel de referencia. La muestra O27 mostró además presencia simultánea de los determinantes w y r (subtipo adywr). La reactividad para ambos AcM de subtipo pareció, pues, responder, en estas dos muestras, a la verdadera coexistencia de determinantes de subtipo mutuamente excluyentes, siendo causada por reacciones de cruce en los casos restantes.

d.1.2 Muestras del subtipo adw4.

Las muestras de este subtipo fueron, pues, detectadas de forma indirecta debido a su reacción de cruce con el AcM anti-y empleado en el estudio. Posteriormente, la falta de reactividad con el AcM anti-y 3457 y su reactividad para 4111 (anti-w) permitió clasificarlas como adw, distinguiéndolas de las muestras con coexistencia de determinantes de subtipo, reactivas para 3457. De los dos subtipos adw (adw2, adw4) del panel de referencia, solo adw2 estuvo exento de reacciones de cruce con los AcM H10C y 4C6, por tanto las muestras en cuestión debían pertenecer al subtipo adw4. Tres de éstas muestras pudieron ser subtipadas como adw4 por PCR, hecho que pudo comprobarse en una de ellas mediante antisueros de referencia. En la figura 22 se muestran las secuencias del fragmento 101-180 del HBsAg correspondientes a las tres muestras subtipadas por PCR, comparándose con secuencias publicadas de todos los subtipos y grupos genotípicos. Tal y como era de esperar, todas ellas pertenecieron al genotipo F, englobado exclusivamente por muestras del subtipo adw4. Las muestras 851H-2 y 413-2 son muestras de seguimiento tomadas 18 y 13 meses después respectivamente.

adw2	A	QGMLPVCPLIPGSTTTTSTGPCKTCTTPAQGNSMFPSCCCTKPTDGNCTCIPIPSSWAFAYLWEWASVRFSWLSLLVPFV	(5)
ayw1	A	-----R-----	(1)
ayw1	B	-----S-----R-----T-----	(7)
adw2	B	-----S-----T-----	(1)
adrq-	C	-----L--TS-----I--T-----S-----VRF-----A--	(4)
adrq+	C	-----L--TS-----I--T-----S-----RF-----A-----	(1)
adrq+	C	-----L--TS-----I--T-----S-----RF-----N-----	(1)
adrq+	C	-----L--TS-----I--T-----S-----RF-----	(2)
ayr	C	-----L--TS-----R-----T-----S-----RF-----A-----	(1)
ayr	C	-----L--TS-----V--R--I--T-----S-----RF-----	(1)
ayw2	D	-----S-----R-----T--Y-----S-----G-F-----A-----	(5)
ayw3	D	-----S-----R--M--T--T--Y-----S-----G-F-----A-----	(7)
O27-1	D	----- S -----T-----F-----A-----	
O27-2	D	----- S -----T-----G-F-----A-----	
Z29	D	-----TV--T--Y-----S-----G-F-----A-----	
ayw4	E	-----S-----R--L--T-----S--S-----G-F-----A-----	(2)
ayw4	E	-----S-----R--M--L--T-----S--S-----G-F-----A-----	(1)
adw4	F	-----L--T-----S--S-----LG-----A-----Q--	(4)
851H-1	F L--T-----S--S-----LG-----A-----Q--	
851H-2	F	----- L-----L--T-----S--S-----LG-----A-----Q--	
413-1	F	----- L-----L--T-----S--S-----LG-----A-----Q--	
413-2	F	----- L-----L--T-----S--S-----LG-----A-----Q--	
Z20	F	----- L-----L--T-----S--S-----LG-----A-----Q--	

Figura 22: comparación de las secuencias de las muestras con reactividad simultánea para determinantes d/y con las de todos los subtipos de HBsAg. Las secuencias de las muestras se resaltan en negrita. La letra consignada a continuación del subtipo alude al genotipo. El número entre paréntesis al final de cada secuencia indica el número de secuencias iguales que figuran en el trabajo del que se tomaron las secuencias de los subtipos (47).

Sus secuencias no contienen cambios con respecto a las respectivas anteriores, lo cual está de acuerdo con el rango de mutación del VHB (10^{-5} sustituciones/posición/año). Estos datos apoyan lo dicho en trabajos previos acerca de la homogeneidad del subtipo adw4 (47, 48). Sin embargo, las secuencias publicadas en dichos trabajos proceden de Francia, país donde, al igual que en España, adw4 debe ser considerado un subtipo alóctono a la vista de su escasa presencia. Este subtipo sólo alcanza prevalencias importantes en algunos países sudamericanos como Argentina o Chile (94), y en varias islas polinésicas (hecho del que podrían derivarse interesantes conclusiones acerca de la procedencia del hombre americano), sin que se disponga de la secuencia de cepas de estas áreas que puedan avalar la homogeneidad de adw4. Además de ser frecuente entre la población general de Chile y Argentina, el subtipo adw4 resultó ser el único presente entre los indios Cuivas de Venezuela (94), pese a estar prácticamente ausente en la población general de los países circundantes (no existen datos sobre el resto de Venezuela). Las cepas adw4 españolas podrían, pues, proceder de la población indígena sudamericana, habiendo sido importadas en cualquier momento posterior a la colonización. Sin embargo, su escasa presencia (ver más adelante) aboga por una introducción no muy lejana. Las cepas francesas podrían tener el mismo origen, aunque este país mantiene posesiones en Polinesia desde donde podría, igualmente, haber sido importado, en cuyo caso la homogeneidad del subtipo sería evidente, dada la similitud entre las cepas francesas y españolas (figura 22).

Si excluimos los dos casos con mezcla de subtipos, sólo tres de las 21 muestras con reactividad para ambos determinantes de subtipo por EIA indirecto han podido ser totalmente caracterizadas como adw4. Solamente ocho de las 18 restantes pudieron ser ensayadas con el resto de los AcM, comportándose de igual manera que las tres precedentes y quedando clasificadas como adw. En la tabla XIII figuran los resultados de dos de ellas (O84, S99). Pese a no disponerse del subtipado completo podemos considerar a estas ocho muestras como adw4, ya que adw2 no cruza con ningún AcM anti-y. Las diez muestras restantes sólo pudieron ser caracterizadas frente a los AcM del estudio de distribución (tabla XII), por lo que no podemos discernir de forma definitiva si contienen un subtipo ad de

los que cruzan o una mezcla de subtipos. Los bajos porcentajes obtenidos en EIA de inhibición en seis de ellas, ($< 38\%$) contrastan con los obtenidos con las dos muestras con mezcla de subtipos ($> 76\%$), inclinándonos hacia la primera posibilidad. Las cuatro restantes no pudieron ser ensayadas en EIA de inhibición. La presencia de adr no ha podido ser demostrada en ninguna de las muestras precedentes, siendo además menos probable que la de adw4, dado su origen geográfico. Si consideramos, de una forma un tanto especulativa, como adw4 a las 21 muestras, la prevalencia media de este subtipo en el grupo 1 sería de un 2.2 %, oscilando entre el 4% en Madrid y Barcelona y el 0.7% en Asturias, estando ausente únicamente en Valladolid y Navarra. No resultó especialmente frecuente en ninguna población de riesgo, apareciendo en una u otra de forma aleatoria en cada localidad.

Resulta, sin embargo, llamativa su distribución en las instituciones para disminuidos psíquicos del grupo 3 (tabla X), ya que, pese a que sólo fue detectado en tres centros, fue el único encontrado en dos de ellos (Segovia 3: muestra S82, y Zamora 1: S99, S100, S101). En la otra institución (Valladolid 1: muestra S106) coexistió con ad (adw2) y ay. Estos resultados resaltan el aislamiento epidemiológico de estas instituciones cerradas frente a la población normal, llegando a circular de forma exclusiva subtipos muy minoritarios en la población normal, transmitiéndose dentro de la propia institución a través de vías desconocidas. La institución Zamora 1 constituye un buen ejemplo de propagación de la infección a partir de un caso índice, ya que la importación de más de un caso de un subtipo tan poco usual resulta muy improbable.

Por último, no debemos excluir la posibilidad de que adw4 tenga una presencia mayor que la reflejada en el estudio, ya que, al haberlo detectado en primera instancia por una reacción de cruce, podríamos haber perdido los casos con una concentración de HBsAg lo suficientemente baja como para que la señal de cruce sea indetectable, mientras que la específica quede por encima del valor de corte, resultando la muestra clasificada normalmente como ad. No obstante, la prevalencia de adw4 calculada en este estudio está de acuerdo con los datos de países circundantes (94).

d.1.3 Muestras con coexistencia de determinantes de subtipo

Únicamente dos de entre todas las muestras positivas simultáneamente para los dos AcM de cribado parecieron contener verdaderamente ambos determinantes de subtipo, al ser posteriormente reconocidas por el resto de los AcM, incluido el 3457. Ambas pudieron ser subtipadas por PCR, y secuenciados sus fragmentos 101-180 del gen de HBsAg (figura 22).

La muestra Z29 fue subtipada como adyw, siendo, sin embargo amplificadas exclusivamente genomas del grupo ayw2/ayw3. Sorprendentemente, su secuencia presentaba lisina en la posición 122, debiéndose considerar del subtipo ad por este criterio, en clara discrepancia con los resultados de PCR. Sin embargo, quedó englobada dentro del genotipo D, integrado, hasta la fecha, exclusivamente por los subtipos ayw2 y ayw3. La tirosina en posición 134 se considera, igualmente, específica de ayw2 y ayw3, estando presente en Z29. Resulta también llamativo el hecho de que sea valina el residuo 128, posición ocupada por alanina en todas las secuencias publicadas hasta el momento. La posición 160 está ocupada por una lisina, de acuerdo con la expresión del determinante w. Este caso corresponde a un paciente de 55 años procedente de Zaragoza, sin factores de riesgo conocidos, anti-HBe positivo y afectado de cirrosis hepática.

El caso O27 no sólo presentó doble reactividad para los determinantes d/y, sino también para w/r, siendo subtipado como adywr. Sin embargo, sólo se amplificaron secuencias del grupo adw2/adr. De acuerdo con este último resultado, la secuencia resultó del subtipo adw, al tener lisina tanto en 122 como en 160. La secuencia correspondiente a la muestra de seguimiento O27-2 presentó los mismos residuos en las posiciones clave 122 y 160, aunque mostraba variaciones en otras tres posiciones. La tasa de mutación resultante sería de 8×10^{-3} sustituciones/posición/año, en claro contraste, tanto con las estimaciones admitidas actualmente, en torno a 10^{-5} , como a lo observado en los casos 851H y 413, pertenecientes al subtipo adw4. Este caso corresponde a un paciente de 47 años, que lleva toda su vida internado en instituciones para disminuidos psíquicos. Su historia familiar se desconoce ya que fue abandonado por sus padres en los primeros momentos de su vida. A pesar de no sufrir síndrome de Down, este paciente presenta rasgos mongoloides no atribuibles a ninguna otra patología congénita, según afirman los

médicos que le tratan (Dra. Amelia González com. pers.). Podría tratarse, pues, de un rasgo étnico, siendo hijo de una madre de raza amarilla portadora de HBsAg de subtipo adr o ayr, habiendo contraído la infección en el momento del parto, lo cual explicaría la presencia del determinante r, presente de forma exclusiva en Extremo Oriente. Su condición de portador positivo para HBeAg resultaría compatible con la infección perinatal.

La expresión simultánea de determinantes excluyentes de subtipo no pudo ser, pues, correlacionada con la amplificación de secuencias de distinta especificidad en ninguno de los dos casos. En uno de ellos la especificidad de subtipo obtenida por PCR estuvo de acuerdo con la secuencia obtenida, mientras que en el otro fueron discrepantes. Las secuencias obtenidas en ambos casos comparten la característica de ser del subtipo adw (122, 160 Lys), a pesar de pertenecer al grupo D, integrado exclusivamente por cepas ayw (ayw2, ayw3). En este sentido, las peculiaridades observadas en las secuencias estarían de acuerdo con el carácter antigénico mixto detectado con los AcM. Estos datos, aparentemente contradictorios, podrían explicarse si existieran partículas mixtas generadas por mezcla fenotípica, tal como ha sido descrito en otros casos similares (44, 75). Al hacer la secuenciación sin clonaje previo se habría obtenido la secuencia consenso de la mezcla, que presentaría características de cada una de las cepas individuales, aunque reflejando fundamentalmente la secuencia de la que se encuentra en mayor proporción. La elevada tasa de mutación encontrada en el caso O27, sería un artefacto generado por la escasa repetitividad obtenida al estar secuenciando una mezcla de diferentes estirpes. Creemos que éste es un argumento de peso en favor de la interpretación de la coexistencia de subtipos como una mezcla fenotípica, en lugar de una mezcla genotípica generada por recombinación. El resultado de PCR nos estaría indicando cual de las cepas de la mezcla está replicando con mayor actividad, aunque esta conclusión discreparía con el predominio en la muestra Z29 de genomas con lisina en la posición 122.

Tal como indicábamos en la introducción, se conocen dos posibles causas de mezcla fenotípica de HBsAg: infección simultánea o sucesiva por subtipos diferentes, o salto antigénico producido en un subtipo por mutación en un residuo clave (122, 160). La primera de ellas resultaría probable en el caso O27 ya que

existe coexistencia de los cuatro determinantes de subtipo y las cepas coinfectantes parecen diferir, al menos, en tres posiciones. Al tratarse de un paciente que lleva toda la vida internado en instituciones para disminuidos psíquicos, el riesgo de haber podido sufrir múltiples exposiciones al VHB es elevado. Por otra parte, estas características epidemiológicas son muy semejantes a las de uno de los primeros casos de coexistencia de determinantes de subtipo descritos en la literatura (120), correspondiente a una mujer de 47 años que llevaba internada en centros especiales para disminuidos psíquicos desde la niñez. El único caso adywr completamente caracterizado (75) fue generado por este mecanismo. En cuanto al caso Z29 no disponemos de datos que nos permitan decantarnos por ninguno de los dos mecanismos. Estas dos muestras supusieron el 0.3% del total de casos de portadores de HBsAg, excluyendo los casos de HBV2 ya que fueron detectados por EIA de neutralización, ensayo en el que este tipo de casos pasarían por subtipos normales.

d.2 Ausencia de determinantes de subtipo.

Ocho muestras quedaron indeterminadas al no ser reconocidas por ninguno de los dos AcM específicos de subtipo empleados en el estudio de distribución, a pesar de haberlo sido por el AcM H35C, específico de determinante común. Seis de ellas fueron tituladas hasta punto final en AUSZYME EIA, siendo el menor título obtenido (muestra PA17) de 1/40000, 4000 ng/ml de HBsAg, es decir, cuatrocientas veces por encima del límite de detección del EIA indirecto. Al ser analizadas con el resto de los AcM se obtuvieron tres tipos diferentes de resultados (tabla XIV).

Cinco de ellas (1043, 1157, 2030, 2036, 2501) no fueron reconocidas por el AcM anti-a 3AD5, siéndolo por el AcM anti-y 4C6, aunque no por 3457, y por el AcM anti-w.

La muestra 1056 tampoco reaccionó con 3AD5, diferenciándose del grupo anterior en que no fue reconocida por ningún AcM de subtipo.

A diferencia del resto, la muestra PA17 reaccionó con 3AD5 aunque no con 4B5, siendo reconocida por 4C6 y por el AcM anti-w al igual que las seis primeras muestras.

Tabla XIV. Reactividad con AcM de las muestras inicialmente negativas a determinantes d/y

CASO	a				d			y			w	r
	H35C	1DE2	3AD5	4B5	H95C	3423	M5H7	H10C	3457	4C6	4111	313
1043	0.684	0.407	0.002	0.713	0.001	0.024	0.037	0.035	0.046	0.327	0.250	0.039
1157	0.677	0.465	0.001	0.819	0.051	0.030	0.029	0.031	0.060	0.380	0.409	0.059
2030	0.738	0.830	0.000	0.883	0.054	0.040	0.022	0.037	0.045	0.503	3.000	0.056
2036	1.064	0.924	0.000	0.751	0.038	0.031	0.029	0.012	0.037	0.707	2.758	0.067
O153	0.781	0.482	0.005	ND	0.033	ND	ND	0.026	ND	ND	ND	ND
2501	0.994	0.889	0.021	0.788	0.011	0.029	0.030	0.003	0.029	0.435	0.852	0.076
1056	0.251	0.119	0.008	0.676	0.054	0.025	0.032	0.021	0.035	0.023	0.074	0.035
PA17	0.745	0.491	0.981	0.038	0.003	0.027	0.031	0.017	0.043	0.421	0.262	0.055

ND: no determinado

La muestra O153, negativa para 3AD5, no pudo ser ensayada con todos los AcM de subtipo al no disponerse de suficiente volumen.

Cinco muestras presentaron ADN de VHB a concentraciones detectables por el ensayo de subtipado por PCR. Las secuencias amplificadas fueron del grupo ayw2/ayw3 en todos los casos (tabla XV) independientemente del patrón de reactividad con AcM que presentaran, aunque no fue posible amplificar ADN de VHB en la muestra PA17.

Todas estas muestras, excepto O153, fueron enviadas al "National Institute of Virology" de Glasgow, donde fue secuenciado el fragmento 103-177 del gen del HBsAg. A modo de controles fueron también secuenciadas 27 muestras pertenecientes a los mismos grupos de riesgo (figura XV). Diez de ellas (cinco ad y cinco ay) pertenecientes a adictos a drogas por vía parenteral del grupo 1.b fueron seleccionados como controles para los casos 1043, 1157, 2036 y 1056, así como otras tantas de pacientes sin riesgos de infección conocidos del grupo 1.a provenientes de localidades diferentes de Navarra lo fueron como controles del caso 2030. Dada la homogeneidad exhibida por estas poblaciones de riesgo en cuanto a distribución geográfica de subtipos, no se consideró imprescindible que las localidades de procedencia de los controles coincidieran con las de las muestras, en cuyo caso no se hubiera podido disponer de controles para los casos 1043 y 2036. Dada la peculiar distribución de subtipos encontrada en Navarra, se incluyeron como controles particulares de la muestra PA17 siete muestras (2 ad, 5 ay) procedentes de la misma localidad. Cada uno de los patrones de reactividad con AcM observados pudo correlacionarse con una mutación puntual diferente (fig XV).

Las cinco muestras no reconocidas por el AcM anti-a 3AD5 ni por los AcM anti-y H10C y 3457 presentaron leucina en la posición 143, al contrario que los controles, lo cuales tenían treonina o serina como todas las secuencias publicadas hasta la fecha.

La muestra 1056, negativa para 3AD5 y para todos los AcM de subtipo, presentó la misma mutación en la posición 143 (Thr/Ser → Leu), pero acompañada de una sustitución Pro → Ser en la posición 120.

La muestra PA17, positiva para 3AD5 pero negativa para 4B5 y para los AcM

anti-y H10C y 3457, presentó ácido glutámico en la posición 144, a diferencia de los controles y de todas las secuencias publicadas que tenían ácido aspártico en esta posición.

Tabla XV

CASO	AsP	PCR	AMINOACIDO MUTADO	PROC.	RIESGO
1043	neg	ayw2/3	143	JA	ADVP
1157	neg	ayw2/3	143	MD	ADVP
2030	ayw3	ayw2/3	143	MD	NO
2036	neg	neg	143	AV	ADVP
D153	ND	neg	ND	OV	ADVP
2501	neg	ayw2/3	143	?	?
1056	neg	ayw2/3	143 120	MD	ADVP
PA17	neg	neg	144	NA	SANT

Asp= Contrainmunolectroforesis con antisueros policlonales, Proc.= localidad de procedencia, ND= no determinado, ADVP= adictos a drogas por vía parenteral, SANT= personal sanitario, JA= Jaen, MD= Madrid, AV= Avila, AS= Asturias, NA= Navarra.

Al igual que todos los controles ay, todas las muestras presentaron arginina en la posición 122 y lisina en la 160, de acuerdo con los resultados de PCR y con la reactividad para los AcM 4C6 (anti-y) y 4111 (anti-w). Los controles ad presentaron lisina en ambas posiciones.

Parece, pues, que la posición 143 interviene en los sitios de unión tanto del AcM 3AD5 como de H10C y 3457, pese a no compartir la misma especificidad de subtipo. Sin embargo, los AcM H35C, 1DE2 y 4C6 no parecen verse afectados por este cambio. La distorsión producida en la molécula por el cambio de un residuo polar como serina o treonina por uno hidrofóbico como leucina, justifica fácilmente

el efecto encontrado, cosa que no ocurre con la mutación en 144, ya que el ácido aspártico y el ácido glutámico son aminoácidos de estructura y polaridad semejantes. Sin embargo, la reactividad con los AcM H10C y 3457 también se vio afectada por este cambio. Es destacable que el AcM 3AD5 pudiera unirse al mutante en 144 de la muestra PA17, pese a la contigüidad con el residuo 143, clave para su reactividad. De la misma forma, la unión del AcM 4B5 no se vio afectada por la mutación en 143, pero sí por la de 144. Tal como corresponde a la importancia de la prolina en la estructura de las proteínas, su pérdida en la posición 120 del HBsAg presente en la muestra 1056 tuvo efectos drásticos sobre el determinante y, aboliendo la reactividad de los tres AcM con dicha especificidad. Sin embargo, no pareció afectar al determinante a, ya que la falta de reactividad con 3AD5 puede explicarse por la mutación en 143. La ausencia de determinante w en la muestra 1056 puede ser debida a la falta de reactividad, bien con el AcM anti-a 3207, bien con el AcM anti-w 4111, pues no debemos olvidar que este último AcM, al igual que 3423, 3457, y 313, fue siempre ensayado tras un paso previo de captura mediante el AcM anti-a 3207. Dado que el resto de las muestras fueron reactivas con el AcM anti-w, podemos asegurar que la mutación en 143 no afectó a la fase de captura con 3207, lo cual nos ha permitido achacar la ausencia de reactividad con el AcM anti-y 3457 observada en todas las muestras a la modificación del epítipo reconocido por este último AcM. Sabemos que la unión del AcM 4111 es dependiente de la lisina 160 (46), posición lo suficientemente alejada de 120 como para que nos decantemos por la hipótesis de que fue la captura previa a través del AcM 3207 la que se vio afectada por la pérdida de la prolina en esta posición.

En el caso 2030 se dispuso de una muestra de seguimiento de tres meses, en la que se mantuvo el mismo patrón de reactividad antigénica.

En el capítulo de la introducción correspondiente a variantes anómalas, veíamos como algunas fueron consideradas, por su reactividad con AcM, como defectivas en determinantes de subtipo (46,122,124) y otras como a-defectivas (117,125,126,127,128,129,130), a pesar de que las mutaciones responsables de ambos defectos antigénicos se localizaban en posiciones muy cercanas e incluso coincidentes, como es el caso de la 145, cuyo cambió Gly → Ala inducía ausencia

de determinantes de subtipo (46), mientras que cuando era Gly → Arg producía ausencia de expresión de determinante común con expresión normal de determinante y de subtipo al ser medida con unos AcM (126), mientras que producía ausencia de determinante d de subtipo y alteración del determinante a al ser medido con otros (128)(figura 23). En el presente estudio se han manejado varios AcM para cada determinante, demostrándose que cada una de las muestras podía haber sido considerada como defectiva en determinante común, defectiva en determinantes de subtipo o como un subtipo ay normal dependiendo de los AcM considerados. La denominación de una variante como defectiva en uno u otro determinante es, pues, relativa, y depende de los reactivos utilizados, ya que cada determinante de subtipo parece estar constituido por diversos epítomos reconocibles por AcM. Así, todos los AcM anti-a reconocieron a todos los miembros del panel de referencia, tal como corresponde a su especificidad, sin embargo, solo H35C y 1DE2 se comportaron de esta manera con las variantes antigénicas, mostrando los AcM 3AD5 y 4B5 un comportamiento diametralmente opuesto con respecto a las mutaciones en 143 y 144. Por último, el AcM 3207 pareció verse afectado únicamente por la posición 120, aunque también lo fue por mutaciones en 145 cuando el cambio fue Gly → Arg (128), pero no Gly → Ala (46). Por todo ello, pensamos que estos cinco AcM reconocen, al menos, cuatro epítomos diferentes dentro del determinante común del HBsAg. De forma similar, cada uno de los tres AcM anti-y parece reconocer un epítomo diferente dentro de este determinante, ya que el AcM H10C se vio afectado por todas las mutaciones al igual que 3457, pero ambos se diferenciaron en su comportamiento con los subtipos adw4 y adr, con los que sólo cruzó el primero. El AcM 4B5 no se vio afectado por las mutaciones en 143 y 144, diferenciándose en ello de los dos anteriores. Los antecedentes bibliográficos nos muestran que H10C no parece ser dependiente exclusivamente la arginina en 122, ya que no se vio afectado por la variación artificial de este residuo (68). Sin embargo, un simple cambio de lisina a arginina en esta posición fue suficiente para inducir la reactividad de el AcM 3457 (44, 74). Del AcM 4B5 no sabemos más que no es afectado por la variación del aminoácido 145, lo cual estaría de acuerdo con nuestros resultados, que revelan su independencia de 143 y 144. En cuanto a los tres AcM específicos de

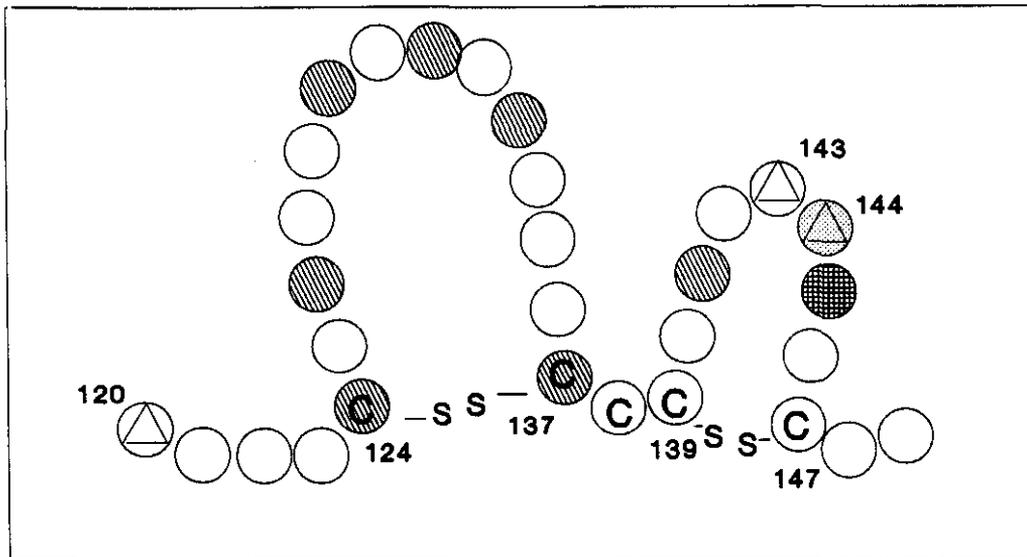


Figura 23.- Situación de las mutaciones encontradas en nuestras muestras en comparación con las descritas en la literatura.

- determinante común
- uno u otro según el artículo
- determinante d/y de subtipo
- △ descritas en este trabajo

Los residuos marcados con C corresponden a cisteínas, indicándose los puentes disulfuro responsables de la formación de bucles antigénicos. Los números indican la posición dentro de la secuencia del HBsAg.

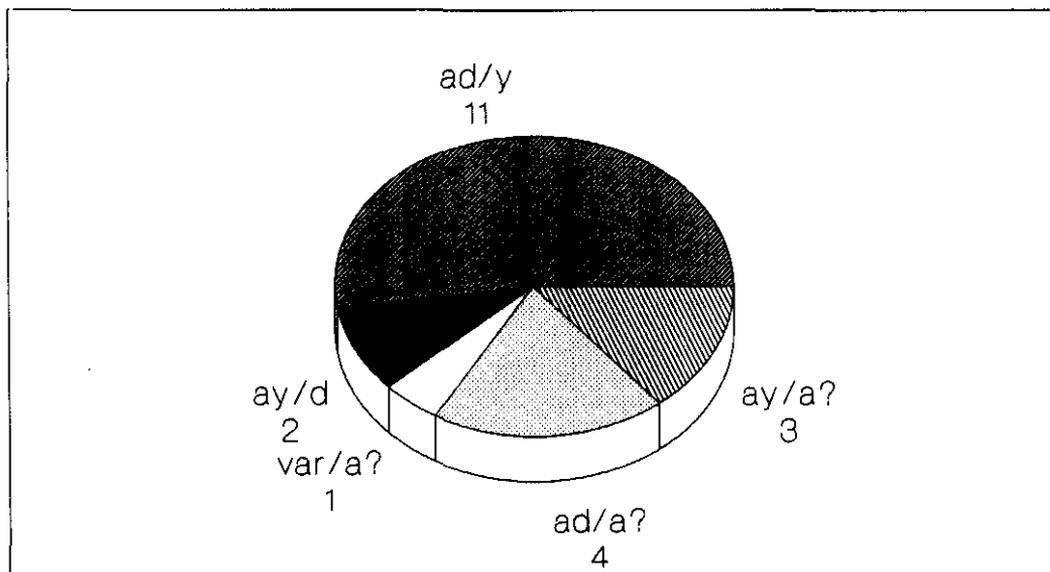


Figura 24.- Resultados de un estudio de subtipado de HBsAg y anti-HBs.
Subtipo HBsAg / Subtipo anti-HBs (ver texto)
número de muestras

determinante d, poco podemos aportar, salvo coincidir con otros autores (68) al no encontrar indicios que permitan sospechar la existencia de varios epítomos dentro del determinante d. Tanto H95C (63) como 3423 (44,76) son AcM dependientes de la posición 122, sin que existan datos publicados sobre M5H7. Finalmente, tanto 4111 como 313 son dependientes de la posición 160 (69). La reactividad con antisueros policlonales no se vio afectada por la mutación puntual en 143, debido a que estos reactivos pueden continuar reconociendo otros epítomos no mutados dentro del mismo determinante. Por esta razón, y teniendo en cuenta que los subtipos de HBsAg fueron descritos mediante estos reactivos, creemos que los antisueros policlonales deben constituir los reactivos de referencia para el subtipado de HBsAg.

De todas las mutaciones encontradas en nuestras muestras, solo la 144 Asp → Glu ha sido descrita previamente (46). Fue considerada como una variante defectiva en determinantes de subtipo, ya que fue caracterizada los mismos AcM del Instituto de Inmunología de Tokio que hemos empleado en este trabajo, conclusión a la que se también se hubiera llegado con los de laboratorios Abbott, pero no con los de Sorín Biomédica, habiendo sido considerada como una variante defectiva en determinante común en este último caso.

La mayoría de las variantes antigénicas descritas previamente fueron detectadas por su capacidad de infectar en presencia de anti-HBs inducido por la infección natural o por vacunación, o de anticuerpos monoclonales frente a determinante común administrados como medida profiláctica tras el trasplante hepático a pacientes portadores de HBsAg (129). La caracterización antigénica y la determinación de la mutación responsable fueron hechas con posterioridad. El trabajo donde se describe la mutación 144 Asp → Glu (46) constituye una excepción a esta norma, ya que las variantes fueron detectadas de la misma manera que las nuestras, es decir, directamente por sus alteraciones antigénicas, cuya base molecular pudo ser posteriormente establecida. Sin embargo, desconocemos el significado biológico y la importancia sanitaria de dichas mutaciones. Según el modelo de cuasiespecies (118), la población de un virus que infecta a un individuo es una mezcla de diferentes variantes en la que predominan aquellas con mayor adaptación al medio existente en el huésped. El resto

continuaran siendo miembros minoritarios de la población, a menos que aparezca un nuevo factor en el medio que les confiera ventaja sobre las estirpes mayoritarias, en cuyo caso las desplazarán, emergiendo como población dominante. Este tipo de variantes antigénicamente alteradas podrían, pues, encontrarse de forma habitual en los portadores de HBsAg, aunque enmascaradas por las cepas predominantes, definidas en nuestro caso por las secuencias de los controles. El predominio de variantes antigénicamente alteradas encontrado en las muestras objeto de este apartado debería, pues, tener su causa en algún factor selectivo. La enorme proximidad de las mutaciones aquí descritas a las posiciones alteradas en las variantes capaces de escapar a la respuesta inmune (figura 23), permite sospechar que puedan compartir esta misma propiedad. En este sentido, dos de nuestros casos mostraron coexistencia de HBsAg y de anti-HBs, aunque, por otra parte, durante un estudio de subtipado de HBsAg y anti-HBs hecho sobre 21 muestras con coexistencia de dichos marcadores, sólo una de ellas (2501) mostró anomalías antigénicas. Sin embargo, en 13 de ellas las especificidades del HBsAg y del anti-HBs fueron diferentes (figura 24), de acuerdo con otros trabajos previos (156,157,158,159,160,161,162). El subtipado de anti-HBs fue realizado mediante un EIA de neutralización semejante al descrito para subtipado de HBsAg, pero empleando por separado HBsAg ad y ay como neutralizante, de forma que si el porcentaje de neutralización era superior a 50 con ad e inferior con ay, el anti-HBs se consideraba como anti-d, a la inversa como anti-y, siendo considerado como anti-a de subtipo desconocido (anti-a? en la figura) cuando era superior a 50 con los dos. Dado que el determinante inmunodominante es el a, cabría esperar que el anti-HBs de pacientes inmunes fuera neutralizado por ambos subtipos, quedando indeterminado en la mayoría de los casos, por lo que el método no resultaría válido. Por ello, el anti-HBs encontrado en estas 13 muestras se puede considerar como monoespecífico de subtipo, pudiendo provenir de una infección previa con una variante no inductora de respuesta inmune frente a determinante a, cuyos anticuerpos, por tanto, no protegieron frente a una segunda infección por un subtipo normal. La muestra 2501 nos mostraría el caso inverso. Sin embargo, no pudimos disponer de un panel de pacientes convalecientes tras la infección por un HBV previamente subtipado lo suficientemente completo como para poder valorar

adecuadamente la técnica de subtipado de anti-HBs, razón por la cual se ha decidido no incluir este estudio como un apartado de la tesis y comentarlo aquí de forma breve, y siempre considerando este inconveniente metodológico a la hora de valorar los resultados. Ninguno de los trabajos publicados con anterioridad que emplean esta misma técnica aporta dicha valoración. La mayoría de las variantes aquí descritas se encontraron en ausencia de anti-HBs, sin que exista, por tanto, presión inmunológica que justifique su selección. Estos pacientes podrían haber sido directamente infectados por el mutante, que habría sido previamente seleccionado en el huésped que los contagió. En este sentido, se han descrito casos de transmisión vertical de variantes 144 Asp → Glu en ausencia de vacunación del neonato (46).

La propia detección de las muestras en EIA indirecto podría abogar en contra de la posible capacidad de escape de estas variantes a la respuesta inmune, ya que supone su reactividad con anti-HBs policlonal en la fase de captura. Sin embargo, ésta podría estarse verificando a través de anticuerpos no neutralizantes, aun cuando los epítomos claves en la neutralización viral estuvieran alterados.

En cualquier caso, la respuesta última al significado biológico y a la posible importancia patológica de estas mutaciones deberán darla experimentos de transmisión a animales previamente inmunizados.

Dos de los pacientes que presentaban estas variantes fueron positivos para HBeAg, mientras que uno de los seis restantes, todos anti-HBe positivos, lo fue durante años, produciéndose la seroconversión tras tratamiento con interferón α . En dos de los cinco restantes se pudo amplificar ADN de VHB por PCR. Asimismo, las muestras 1043, O153 y 1056 presentaban serología positiva a VHD. Todos estos datos nos muestran que las mutaciones detectadas no alteran la capacidad replicativa de los virus ni las funciones de ayuda necesarias para el establecimiento de infección por VHD. La variante 144 Asp → Glu, fue la única que no pudo asociarse marcadores de replicación activa ni a infección por VHD.

Las ocho muestras portadoras de variantes pertenecían al grupo 1, aunque tres de ellas no procedían de ninguna localidad de las analizadas en el estudio de distribución de subtipos. Las cinco restantes supusieron el 0.9% del total del grupo, oscilando entre un 0.4% para los pacientes sin riesgos de infección

conocidos (subgrupo a) y un 2.3% para los ADVP. Los únicos datos publicados de prevalencia de este tipo de variantes proceden de un estudio de subtipos en más de 5000 donantes de sangre japoneses, entre los que encontraron variantes defectivas en determinantes de subtipo (tanto d/y como w/r) con una prevalencia del 0.08% (122), unas diez veces menor que la aquí descrita. Las mutaciones encontradas en Japón afectaban a las posiciones 160, 145 y 144 (46), coincidiendo únicamente con nosotros en este último caso. Resulta llamativo que en un trabajo tan amplio no hayan encontrado la mutación en 143, la más frecuente en nuestro estudio, ya que, además, los AcM por ellos empleados fueron el 3207, 3423, 3457, 4111 y 313. El AcM anti-y 3457 no reacciona con estas variantes dando un patrón de ausencia de determinantes de subtipo en muestras ay. Sin embargo, este subtipo es muy infrecuente en Japón (122), donde la práctica totalidad son ad, subtipo donde no hemos encontrado dicha mutación, bien porque el mutante no sea viable, bien porque no afecta al epítipo reconocido por el AcM H95C, habiendo pasando desapercibidas. De la misma forma, la unión con el AcM anti-d empleado por ellos (3423) podría no verse afectada por dicha mutación en 143. Sin embargo, aquí queda demostrado que la mutación 144 Asp → Glu descrita originalmente en adr, puede ocurrir también en ayw3. La causa de que no hayamos encontrado la mutación 145 Gly → Arg, descrita en Italia (126), Inglaterra (127), Japón (128) y Singapur (117), podría, igualmente, estribar en que dicha mutación no afectó a la reactividad de ninguno de los tres AcM empleados en el estudio inicial.

La mayoría de los EIA comerciales de detección de HBsAg empleados en el diagnóstico de la infección y en los bancos de sangre emplean AcM específicos de determinante común en la fase de captura o como conjugados. Si el AcM 3AD5 se hubiera empleado con estos fines, el ensayo hubiera sido incapaz de detectar HBsAg en las siete muestras portadoras de mutantes en la posición 143, algunas de las cuales deben considerarse altamente infecciosas al ser positivas para HBeAg. Cabe esperar que dentro de la amplia oferta comercial de este tipo de equipos haya algunos que puedan incluir anticuerpos monoclonales incapaces de detectar estas variantes, pudiendo causar errores diagnósticos, ocasionando, incluso, casos de hepatitis postransfusional. Sería importante, pues, que este tipo de variantes

fuesen consideradas en los protocolos de valoración de ensayos de detección de HBsAg ya que, pese a su escasa presencia porcentual, el número de casos de infección por VHB diagnosticados anualmente es lo suficientemente alto como para que puedan producirse errores graves en un número apreciable de muestras.

DISCUSSION GENERAL

La disponibilidad de herramientas metodológicas capaces de diferenciar grupos de cepas de un mismo agente resulta de gran interés para el conocimiento de la epidemiología de las enfermedades infecciosas. El análisis antigénico mediante antisueros permitió el establecimiento de tipos y subtipos de muchos agentes que resultaron excelentes herramientas epidemiológicas. En algunos casos, el tipado excede dicho interés epidemiológico, existiendo correlaciones entre tipos o subtipos y diferentes manifestaciones clínicas de la infección. La introducción de los anticuerpos monoclonales y el desarrollo de las técnicas de biología molecular hizo posible la extensión de estos estudios a virus no cultivables y llevó la capacidad de discriminación más allá de los tipos y subtipos, propiciando el nacimiento de una nueva disciplina denominada Epidemiología Molecular, cimentada en los conocimientos adquiridos previamente con los métodos clásicos. Los subtipos de VHB fueron descritos a principios de los años 70 (27), revelándose como marcadores epidemiológicos útiles en estudios de transmisión y circulación viral (106, 107, 109). Cada uno de ellos presenta una distribución geográfica característica (94), siendo la distribución descrita en los países que circundan a España (94) excesivamente compleja para extrapolar datos, siendo previsible, incluso, diferencias geográficas dentro del país, limitándose los únicos datos publicados al área de Barcelona (111,175). Por otra parte, las conclusiones expresadas en diversos trabajos acerca de las posibles diferencias de patogenicidad entre subtipos son, sin embargo, frecuentemente contradictorias (104,106,109, 110,113,114,115).

Con estos precedentes, nos planteamos una serie de interrogantes que pretendimos responder mediante un estudio de distribución de subtipos en diversas localidades de España. Como es norma en todo trabajo de investigación, de las respuestas fueron surgiendo nuevas preguntas, algunas de las cuales pudieron ser, a su vez, abordadas.

¿Cual son los métodos y reactivos más idóneos para subtipar HBsAg?

En la introducción ha quedado reflejada la gran diversidad de métodos descritos. A los primeros ensayos de difusión en gel o contraímmunoelectroforesis con antisueros policlonales, con los que fueron descritos los subtipos de Hbsag

(23, 25, 27, 28), siguieron los enzimoimmunoensayos con anticuerpos monoclonales (63, 64, 82, 83, 84), y, una vez conocida la base molecular de los subtipos de HBsAg, la reacción en cadena de la polimerasa (85, 86, 87, 88) y la secuenciación (90). En el presente trabajo se han podido manejar cinco anticuerpos monoclonales específicos de determinante común, tres de determinante d, tres de determinante y, uno de determinante w y otro de determinante r, que se han ensayado por enzimoimmunoanálisis basados en tres principios diferentes. También se ha desarrollado un método de subtipado por reacción en cadena de la polimerasa que se ha aplicado sobre muestras que arrojaron resultados de difícil interpretación. Por último, algunas muestras se enviaron a otros laboratorios para su análisis por contrainmunolectroforesis con antiseros policlonales de referencia o por secuenciación.

El enzimoimmunoanálisis con anticuerpos monoclonales constituyó el método idóneo para realizar estudios de subtipado sobre grupos numerosos de muestras debido a su elevada sensibilidad y sencillez metodológica. Las diversas aproximaciones empleadas se complementaron entre sí permitiendo el subtipado de la práctica totalidad de las muestras. Sin embargo, algunos anticuerpos monoclonales específicos de determinante y presentaron reacción cruzada con los subtipos adw4 y adr, ambos muy infrecuentes en nuestro medio, razón por la cual sólo constituyó un problema en un escaso porcentaje de muestras. Sin embargo, su uso en Extremo Oriente, Polinesia o algunas zonas de Sudamérica, donde estos subtipos son frecuentes (94), sería inviable. Por otra parte, al analizar variantes antigénicas portadoras de mutaciones en los dominios antigénicos del HBsAg se observaron discrepancias entre AcM de la misma especificidad de subtipo, hecho que no debe extrañarnos, ya que los determinantes de subtipo fueron descritos con antiseros policlonales (27), conteniendo, de hecho, diversos epítomos reconocibles por AcM (68, 71). De hecho, los diferentes resultados obtenidos nos muestran que los cinco monoclonales específicos de determinante a que hemos manejado van dirigidos, al menos, frente a cuatro epítomos diferentes, y que cada uno de los tres anticuerpos monoclonales específicos de determinante y reconoce un epítomo diferente.

El subtipado por PCR fue útil en la resolución de los casos indeterminados

por EIA indirecto (88). Su gran especificidad potencial permitiría el subtipado de casos de infección por VHB en ausencia de HBsAg detectable (87). Sin embargo, incluso los ensayos de PCR más sensibles son incapaces de detectar ADN de VHB en algunos portadores asintomáticos de HBsAg. Finalmente, la contrainmunolectroforesis con antisueros policlonales debe constituir el método de referencia, ya que fue el utilizado originalmente en la descripción de los subtipos (27).

¿Que subtipos de VHB circulan en España?

La circunscripción estricta del determinante r a Extremo Oriente (94) nos llevó a prescindir del análisis de determinantes w/r para el estudio de distribución de subtipo. El AcM anti-y empleado en el estudio presentó reacción cruzada con el subtipo adr; sin embargo, ninguna de las muestras con reactividad simultánea para d e y ensayadas para determinantes d/r resultó ser de este subtipo. La presencia de ayr entre los casos subtipados como ay es extremadamente improbable, dada su enorme infrecuencia incluso en los países donde es autóctono (94). Solamente hemos detectado determinante r en uno de los casos de mezcla de subtipos (adywr).

Los subtipos ad y ay fueron encontrados con una frecuencia similar en la población general, dominando ay en los adictos a drogas por vía parenteral. Solamente se subtiparon totalmente siete muestras ay que fueron ayw3 y nueve ad que fueron adw2, independientemente de la población de riesgo a la que perteneciesen las muestras. La presencia del subtipo adw4 pudo ser detectada por su reacción de cruce con el AcM anti-y, por lo que su prevalencia, aunque esporádica, es difícil de establecer con exactitud.

¿Que valor como marcadores epidemiológicos tienen los subtipos de HBsAg en nuestro medio?

La distribución geográfica de subtipos fue homogénea en todas las poblaciones de riesgo consideradas, lo cual hace, en gran medida, extrapolables las conclusiones del estudio a localidades que no han sido incluidas. La similar presencia de ad y ay encontrada en la población general, puede interpretarse como

la componente de la influencia centroeuropea, donde prevalece ad, y la mediterránea y norteafricana, donde domina ay (94). Los adictos a drogas por vía parenteral se caracterizaron por una prevalencia de subtipo ay, hecho que ya había sido puesto de manifiesto con anterioridad en otros países europeos y en Estados Unidos (101, 102, 103, 104, 105, 106), y que nos indica su elevado grado de aislamiento epidemiológico respecto de la población general. El grupo integrado por pacientes con otros riesgos de infección presentó una situación intermedia debido, probablemente, a su contacto con los toxicómanos, e incluso, a la presencia de adictos a drogas por vía parenteral no declarados. Cada una de las instituciones para deficientes mentales con régimen de internado presentó una distribución de subtipos particular e independiente de la población general comportándose, en este sentido, como instituciones cerradas donde el virus se propaga eficazmente en su interior.

Los subtipos de VHB han resultado, pues, útiles para establecer las pautas de circulación del virus en la comunidad, permitiendo detectar ciclos con mayor o menor grado de independencia. La complejidad observada nos muestra la necesidad de disponer de este tipo de datos si se deseara utilizar los subtipos de VHB para estudios específicos de transmisión.

¿Son todos los subtipos de VHB igual de patógenos?

La distribución de subtipos se mostró independiente de la presencia de HBeAg. Tomando éste como indicador de replicación activa, y, por tanto, de mayor patogenicidad, ambos subtipos serían igualmente patógenos, de acuerdo con la idea generalmente admitida (109, 113, 114). La asociación del subtipo ay con una mayor severidad de síntomas encontrada en algunos trabajos (104, 115), podría deberse a sesgos introducidos al mezclar poblaciones heterogéneas en cuanto a su distribución de subtipos y su prevalencia de HBeAg.

¿Tienen ad y ay la misma capacidad de apoyar la infección por el Virus de la Hepatitis Delta?

El Virus de la hepatitis Delta es incapaz de completar por si solo su ciclo de replicación, requiriendo del aporte de ciertas funciones por parte del VHB, e incluso

utilizando sus envueltas virales para recubrirse (81). Al ser el HBsAg el principal componente de dichas envueltas podría existir alguna influencia del subtipo de VHB en la capacidad de ser usadas por el VHD. Sin embargo, la tasa de infección por VHD fue similar para ambos subtipos de VHB cuando se compararon grupos homogéneos. Es importante resaltar que de haber realizado el estudio sobre el total de la muestra hubiéramos llegado a la conclusión errónea de que el subtipo ay auxilia con mayor eficacia al VHD, debido al sesgo introducido por el hecho de que tanto la mayor prevalencia de ay como la mayor tasa infección por VHD confluyen en el grupo de adictos a drogas por vía parenteral por razones independientes. La mayor patogenicidad del subtipo ay encontrada por algunos autores, a la que antes aludíamos, podría ser producto de un artefacto similar.

¿Existe expresión de determinantes de subtipo de VHB en los casos de VHB2?

La baja reactividad para HBsAg encontrada en estas muestras permitió únicamente su ensayo por EIA de neutralización, método donde sólo fue posible ensayar los AcM anti-d y anti-a, pero no el anti-y. Todas las muestras ensayadas fueron reconocidas por el AcM anti-a así como el 74% de ellas lo fue por el anti-d, siendo, pues clasificadas como ad. El 26% restante fueron consideradas ay por exclusión, pudiendo ser comprobado el resultado en cuatro de ellas que fueron detectables por EIA indirecto.

La expresión de determinantes de subtipo en estos casos respalda la especificidad de la reactividad para HBsAg que los caracteriza, y apoya los datos de neutralización con anti-HBs (138, 145, 146), detección de ADN (144, 146) y de microscopía electrónica (138) previamente publicados, que sugerían que el agente responsable de estas reactividades está estrechamente relacionado con el VHB.

La distribución de subtipos entre las poblaciones de riesgo estudiadas presenta características similares a la observada en portadores de VHB, con una mayor prevalencia de ay en toxicómanos que en población general y una situación intermedia en el grupo con otras prácticas de riesgo. Sin embargo, siempre hubo una proporción significativamente mayor de ad en VHB2 que en VHB en todos los

grupos estudiados excepto en los toxicómanos, entre los que las proporciones fueron similares. Ello podría interpretarse interpretarse como que el VHB y el VHB2 sólo comparten la misma vía principal de transmisión en el caso de los ADVP. En este sentido, algunos trabajos apuntan hacia una posible transmisión oral como vía específica del agente implicado en estos casos (146).

¿Qué significa la expresión simultánea de determinantes de subtipo mutuamente excluyentes? ¿Con qué frecuencia ocurre?

Solamente dos de las veintitrés muestras positivas inicialmente para ambos AcM de subtipo presentaron coexistencia de determinantes d/y de subtipo demostrable, siendo once de las restantes del subtipo adw4, que presentaba reacciones de cruce con el AcM anti-y. Al completar el subtipado, una de ellas fue clasificada como adyw, y la otra como adywr al presentar también coexistencia de determinantes w/r. Las peculiares características de ambas secuencias con lisina en posición 122 pero pertenecientes al grupo D, integrado exclusivamente por cepas ayw (47, 48), sugiere que la causa de esta doble reactividad estriba en la mezcla de dos cepas de diferente subtipo más que en la presencia de un solo genoma que codifique para ambos determinantes excluyentes. Esta hipótesis se vio reforzada por el hecho de que la tasa de mutación aparente de la muestra adywr, calculada al comparar las secuencias de dos muestras separadas más de un año, fue muy superior a la descrita para VHB. Al haberse secuenciado directamente amplificadas de PCR se habría obtenido la secuencia consenso de la mezcla, que puede variar en el tiempo en función de las cantidades relativas de sus componentes. Estas mezclas fenotípicas de subtipos han sido encontradas en la naturaleza causadas por dos fenómenos diferentes (75): doble infección (75, 113), simultánea o sucesiva, o salto antigénico por mutación en las posiciones clave 122 ó 160 con coexistencia de la cepa original y la mutada (44, 75). La doble coexistencia de determinantes de subtipo encontrada en la muestra adywr y su grado de variabilidad aparente, nos induce a pensar en una infección doble, sin que tengamos datos para decantarnos entre uno u otro mecanismo en el caso adyw. En ambos casos sólo fue posible detectar ADN de una sola especificidad, hecho que achacamos a que, pese a existir HBsAg circulante de ambas cepas, sólo una

de ellas replica activamente liberando viriones a torrente sanguíneo.

La frecuencia de este fenómeno fue muy escasa, representando solamente el 0.3% del total de las muestras del estudio, de acuerdo con lo encontrado por otros autores (110, 113, 120, 121, 122).

¿Qué significa la ausencia de determinantes de subtipo? ¿Con qué frecuencia ocurre?

Todas las muestras clasificadas en primera instancia como defectivas en determinantes d/y de subtipo al no ser detectadas por el juego de AcM empleado inicialmente, fallaron también frente a un AcM específico de determinante común, al tiempo que todas excepto una reaccionaban con otro AcM específico de determinante y. Cada una de estas muestras podría haber sido clasificada como a-defectiva, y-defectiva o un subtipo ayw normal según el juego de AcM utilizado. La única detectable por contrainmunolectroforesis fue clasificada como ayw3 con reactivos de referencia, al igual que cinco de ellas por PCR (grupo ayw2/3). La clasificación, pues, de una variante como defectiva en determinante común o en determinantes de subtipo es relativa y depende de los reactivos utilizados. En este sentido, conviene ser cauto al valorar estudios de este tipo de variantes antigénicas realizados por grupos diferentes (117, 125, 126, 127, 128, 129). Al considerar las reactividades con AcM en su conjunto, las ocho muestras pudieron ser separadas en tres grupos con patrones diferentes de reactividad, correlacionándose cada uno de ellos con una mutación diferente en posiciones conservadas, 143, 144 y 120, dentro de los bucles antigénicos donde se ubican el determinante común y los de subtipo (38). La posición 120 se encuentra, aunque adyacente, fuera de dichos bucles; sin embargo, se trata de una prolina, aminoácido fundamental para el establecimiento de la estructura terciaria de las proteínas, y cuya sustitución puede ser causa de importantes distorsiones en zonas amplias de la molécula. Sólo una de ellas (144 Asp → Glu) había sido descrita previamente (46), siendo las variantes que la portaban consideradas como defectivas en determinantes de subtipo.

La prevalencia media de estas variantes antigénicas fue del 0.9%, ascendiendo al 2.3% entre los adictos a drogas de administración parenteral.

¿Circulan en España variantes antigénicas de VHB con importancia sanitaria?

Durante los últimos años han sido descritas diversas variantes en HBsAg con capacidad para infectar a individuos inmunizados activamente frente a VHB por vacunación o infección natural, o pasivamente por administración de anticuerpos monoclonales frente a determinante común, siendo la mutación más frecuentemente encontrada 145 Gly → Arg, descrita en Japón (128), Singapur (117), Italia (126) e Inglaterra (127). En el transcurso de nuestro estudio no hemos detectado ninguna de ellas, lo cual puede ser debido a que no presentan reactividad alterada con ninguno de los AcM usados para el estudio de distribución habiendo pasado desapercibidas como ad o ay. Otra explicación sería que no son detectables por los equipos comerciales de HBsAg utilizados en este estudio pasando por muestras negativas para este marcador. Estas variantes fueron detectadas al estudiar casos de infecciones en individuos con anti-HBs, haciéndose con posterioridad su caracterización antigénica y molecular. Sin embargo, nuestras muestras fueron directamente seleccionadas por sus alteraciones antigénicas sin que podamos correlacionar su presencia con ningún rasgo patogénico especial. No obstante, el hecho de que las mutaciones encontradas afecten a posiciones muy cercanas, e incluso adyacentes a las mutadas en las variantes con capacidad de escape a la respuesta inmune, sugiere que puedan compartir esta propiedad de innegable trascendencia para la salud pública, en un momento en que se plantea la extensión de los programas de vacunación más allá de las poblaciones con prácticas de riesgo de infección.

La mayoría de los métodos comerciales de tercera generación para detección de HBsAg dependen en alguno de sus pasos del reconocimiento por un AcM específico de determinante a. Cada una de nuestras variantes antigénicas fue incapaz de reaccionar con alguno de los anticuerpos monoclonales de esta especificidad que, de haber sido empleado para la detección de HBsAg, podría haber llevado a un error diagnóstico, especialmente grave en el seno de un banco de sangre. Por ello, creemos que estas variantes deben ser incluidas en los protocolos de evaluación de métodos de detección de HBsAg, al objeto de seleccionar para su uso en los bancos de sangre aquéllas que muestren mayor capacidad para reconocerlas. Somos conscientes de que las variantes antigénicas

encontradas en este trabajo pueden no incluir todas las que, circulando en España, muestran alteración en la antigenicidad de ciertos epítomos implicados en el determinante común. Pensamos, por ello, que es conveniente ampliar la *prospección de estas variantes al objeto de enriquecer todo lo posible los paneles de evaluación de métodos de detección de HBsAg.*

CONCLUSIONES

1.- El enzimoimmunoanálisis con anticuerpos monoclonales resulta el método de elección para abordar estudios de subtipado de HBsAg dada su sencillez tecnológica y elevada sensibilidad, siempre que se caracterice su especificidad mediante un panel de referencia adecuado. El subtipado mediante PCR lo complementa en la resolución de muestras indeterminadas, tanto por ausencia como por coexistencia de expresión de determinantes de subtipo mutuamente excluyentes, siempre que la contraelectroforesis con antisueros policlonales mono-específicos, método que debe ser considerado como el de referencia, no pueda ser empleado a causa de su limitada sensibilidad.

2.- No se apreciaron diferencias significativas de distribución de subtipos en la población general de las diferentes localidades españolas estudiadas, mostrando el conjunto una similar frecuencia de ad y ay, situación intermedia entre la de Centroeuropa, donde predomina el subtipo adw, y la de los países mediterráneos donde es ayw el de mayor prevalencia. Dentro del subtipo ay parece ser ayw3 el mayoritario, siéndolo adw2 entre los ad, aunque también circula, si bien en escasas proporciones, el subtipo adw4, propio de Sudamérica y Polinesia.

3.- El VHB mantiene pautas de circulación independientes en diferentes grupos de población caracterizados por vías de transmisión particulares. Así, se observó una clara asociación entre el subtipo ay y la adicción a drogas de administración parenteral, similar a la descrita en otros países europeos y en Estados Unidos. En cada uno de los centros de atención a disminuidos psíquicos con régimen interno se encontró una distribución de subtipos particular e independiente de la de la población general, comportándose como comunidades cerradas en cuyo interior el VHB se transmite con eficacia por vías desconocidas. Otros grupos con vías de transmisión particulares como los varones homosexuales, podrían mantener, igualmente, sus pautas de circulación particulares.

4.- La distribución de subtipos ad y ay fue independiente, tanto de la presencia de HBeAg como de la de marcadores de infección por el Virus de la Hepatitis Delta cuando se compararon grupos homogéneos. No se aprecian, pues, diferencias intrínsecas entre ambos subtipos en el grado de replicación viral o en la capacidad de auxiliar la replicación del VHD.

5.- Los subtipos de HBsAg constituyen una herramienta útil para abordar estudios de circulación epidemiológica del VHB. Dichos estudios deben apoyarse en el conocimiento previo de sus patrones de distribución en las distintas poblaciones de riesgo que conviven en la comunidad, a fin de evitar sesgos a la hora de interpretar los resultados.

6.- Las muestras con reactividad aislada para HBsAg en ausencia de otros marcadores serológicos de infección por VHB, fueron reactivas con los anticuerpos monoclonales específicos de determinante común y determinantes d/y de subtipo del Virus de la Hepatitis B, demostrando la especificidad de la reactividad para HBsAg y apoyando la presencia real de un agente estrechamente relacionado con el VHB, que viene siendo denominado informalmente como Virus de la Hepatitis B tipo 2, pese a que su caracterización es aun excesivamente incompleta como para considerarlo como un nuevo tipo del VHB.

7.- La coexistencia de determinantes de subtipo mutuamente excluyentes (adyw, adywr) es un hecho infrecuente, que atribuimos a la mezcla fenotípica de dos subtipos diferentes, uno de los cuales replica de forma activa, siendo sus genomas detectables en suero.

8.- Se ha detectado la presencia de variantes víricas con defectos en la expresión antigénica de epítomos del determinante común y del determinante y de subtipo, que pudieron asociarse a tres mutaciones diferentes que afectan a aminoácidos conservados entre todos los subtipos de HBsAg. Dichas mutaciones no parecen afectar a la capacidad replicativa del virus ni a sus funciones de ayuda al Virus de la Hepatitis Delta, localizándose en posiciones muy próximas, e incluso contiguas,

a otras cuyo cambio se ha visto implicado en la inducción de escape a la inmunidad adquirida tras la infección natural por VHB o conferida por inmunización activa.

9.- Ninguna de las variantes antigénicas detectadas inicialmente por ser defectivas en determinantes de subtipo pudo ser reconocida por todos los anticuerpos monoclonales específicos de determinante común. La definición de una variante como defectiva en determinante común o en determinantes de subtipo basándose exclusivamente en su reactividad con anticuerpos monoclonales es, pues, relativa y depende de los reactivos usados en cada caso. Por otra parte, cualquiera de estas muestras hubiera sido erróneamente considerada como negativa para HBsAg si se hubiera empleado para su detección alguno de éstos AcM específicos de determinante común. Dado que la mayoría de los ensayos comerciales de detección de HBsAg emplea este tipo de reactivos, estas variantes deberían ser consideradas en la evaluación de dichos métodos a fin de evitar posibles errores diagnósticos graves.

BIBLIOGRAFIA

1. **Bailliere, J.B.** (1851) Ouvres completes d'Hippocrate. 7: 237.
2. **Krugman, S., Giles, J.P. & Hammond, J.** (1967) Infectious Hepatitis: Evidence of two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *Journal of the American Medical Association* 200:365-373.
3. **Blumberg, B.S., Alter, H.J. & Vinisch, S.** (1965) A "new" antigen in leukemia sera. *Journal of the American Medical Association* 191:541-546
4. **Blumberg, B.S., Gerstley, B.J.S., Hungerford, D.A., London, W.T. & Sutnic, A.I.** (1967) A serum antigen (Australia Antigen) in Down's syndrome, leukaemia and hepatitis. *Annals of Internal Medicine* 66:924-931
5. **Dane, D.S., Cameron, C.H. & Briggs, M.** (1970) Virus-like particles in serum of patients with Australia Antigen associated hepatitis. *Lancet* i:695-698.
6. **Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z. & Purcell, R.H.** (1973) Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science*, 182:1026-1028
7. **Francki, R.I.B., Fauquet, C.M., Knudson, D.L. & Brown, F. eds.** (1991) The classification and nomenclature of viruses (Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses). *Archives of Virology, supp 2*.
8. **Rizzeto, M., Canese, M.G., Arico, S., Crivelli, O., Trepo, C. & Verme, G.** (1977) Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system (Delta/anti-Delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut*, 18:997-1003.
9. **Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D. & Houghton, M.** (1989) Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244:359-362.
10. **Reyes, G.R., Purdy, M.A., Kim, J.P., Luk, K.C., Young, L.M., Fry, K.E. & Bradley, D.W.** Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247:1335-1339.
11. **Ganem, D.** (1982) Persistent infection of humans with hepatitis B virus: Mechanism and consequences. *Reviews of Infectious Diseases* 4(5):1026-1047.
12. **Marion, P.L. & Robinson, W.** (1983) Hepadnaviruses: Hepatitis B and related viruses. *Current topics on Microbiology and Immunology* 105:99-121
13. **Tiollais, P., Pourcel, C. & Dejean, A.** (1985) The hepatitis B virus. *Nature* 317:489-495
14. **Ganem, D. & Varmus, H.E.** (1987) The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annual Review of Biochemistry* 56:651-693.

15. Chisari, F.V., Ferrari, C., & Mondelli, M.U. (1989) Hepatitis B virus structure and biology. *Microbial Pathogenesis* 6:311-325.
16. Robinson, W.S. hepadnaviridae and their replication. *En: Fields, B.N., Knipe, D. eds. Virology (vol 2) New York: Raven Press 1990:2137-2169*
17. Hollinger, F.B. Hepatitis B Virus. *En: Fields, B.N., Knipe, D. eds. Virology (vol 2) New York: Raven Press 1990:2171-2236.*
18. Saiki, R.K., gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharft, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
19. Blum, H.E., Liang, J.L., Galun, E. & Wands, J.R. Persistence of hepatitis B viral DNA after serological recovery from Hepatitis B Virus infection. *Hepatology* 14(1):56-63.
20. Brechot, C., Kemsdorf, D., Paterlini, P. & Thiers, V. (1991) Hepatitis B Virus DNA in HBsAg-negative patients. Molecular characterizations and clinical implications. *Journal of Hepatology* 13(suppl. 4): S42-S48.
21. Vento, S., Di Perri, G., Luzzati, R., Cruciani, M., garofano, T., Mengoli, C., Concia, E. & Bassetti, D. (1989) Clinical reactivation of hepatitis B in anti-HBs positive patients with AIDS. *Lancet i*:332-333.
22. Vento, S., Di Perri, G., Garofano, T., Concia, E. & Basseti, D. (1989) Reactivation of Hepatitis B in AIDS. *Lancet ii*: 108.
23. Levene, C. & Blumberg, B.S. (1969) Additional especificities of Australia Antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature* 221:195-196.
24. Kim, C.Y. & Tilles, J.G. (1971) Immunologic and electrophoretic heterogeneity of hepatitis-associated antigen. *Journal of Infectious diseases* 123:671-675.
25. Le Bouvier, G.L. (1971) The heterogeneity of Australia Antigen. *Journal of Infectious Diseases* 123:671-675.
26. Soulier, J.P. & Couroucé-Pauty, A.M. (1973) New determinants of hepatitis B antigen (Au or HB antigen). *Vox sanguinis* 25:212-234.
27. Courouce, A.M. & al., ed. (1976) Proceedings of the International Workshop on HBsAg Subtypes, Paris, April 1975. *Basel Karger (Bibliotheca haematologica N° 42)*.
28. Magnius, L.O., Kaplan, L., Vyas, G.N. & Perkins, H.A. (1975) A new virus specified determinant of Hepatitis B surface antigen. *Acta Pathologica of Scandinavia*.

29. Shorey, J. (1976) A new hepatitis B surface antigen. *The Journal of Infectious Diseases* 133(1):1-6.
30. Couroucé-Pauty, A.M., Lemaire, J.M. & Roux, J.F. (1978) New hepatitis B surface antigen subtypes inside ad category. *Vox Sanguinis* 35:304-308.
31. Vyas, G.N. (1972) Australia antigen (Hepatitis B antigen): A conformational antigen dependent on sulphide bonds. *Science* 178:1300-1301
32. Peterson, D.L., Roberts, I.M. & Vyas, G.N. (1977) Partial aminoacid sequences of two major component polypeptides of Hepatitis B surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 74:1530-1534.
33. Peterson, D., Narapendra, N. & Gavilanes, F. (1982) Structure of Hepatitis B surface Antigen. Correlation of subtype with aminoacid sequence and location of the carbohydrate moiety. *The Journal of Biochemical Chemistry* 257(17):10414-10420
34. Gavilanes, F., González-Ros, J.M. & Peterson, D.L. (1982) Structure of Hepatitis B surface antigen. *The Journal of Biological chemistry* 257(13):7770-7777.
35. Peterson D.A., Paul, D.A., Gavilanes, F. & Achord (1984) Hepatitis B surface antigen: protein structure and the development of alternative Hepatitis B virus vaccines. in *Advances in Hepatitis Research*, ed F. Chisari (Masson Publishing U.S.A. Inc., New York):30-39.
36. Gillece-Castro, B.L., Fisher, S.J., Tarentino, A.L., Peterson, D.L., Burginlame, A.L. (1987) Structure of the oligosaccharide portion of human Hepatitis B surface antigen. *Journal of Biological chemistry: (in press, 1987)*.
37. Guerrero, E., Gavilanes, F., Peterson, D.L. (1988) Model of the protein arrangement in HBsAg particles based on physical and chemical studies. in *Zuckerman, A.J. ed.: Viral hepatitis and liver disease. New York, Liss:606-613*.
38. Stirk, H.J., Thronton, J.M. & Howard, C.R. (1992) A topological model for Hepatitis B surface antigen. *Intervirology* 33:148-158.
39. Varghese, J.N., Laver, W.G. & Colman (1983) Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9   resolution. *Nature* 303:35-40.
40. Wilson, I.A., Skehel, J.J. & Wiley, D.C. (1981) Structure of the hemagglutinine membrane glycoprotein of influenza virus at 3   resolution. *Nature* 289:366-373
41. Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M., Zald var, J., Goodman, H. & Rutter, W. (1979) Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B surface antigen. *Nature* 280:153-157.

42. Takeshima, H., Inokoshi, J., Namiki, M., Shimada, J. & Omura, S. (1985) Structural analysis of the coding for hepatitis B surface antigen and its product. *Journal of General Virology* 66:195-200.
43. Okamoto, H., Imai, M., Shimozaki, M., Iizuka, H., Gotanda, T., Tsuda, F., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1986) Nucleotide sequence of a cloned hepatitis B virus genome, subtype ayr. Comparison with genomes of the other three subtypes. *Journal of General Virology* 67:2305-2314.
44. Okamoto, H., Imai, M., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1987) Point mutation in the S gene of Hepatitis B virus for a d/y or w/r subtypic change in two blood donors carrying a surface antigen of compound subtype adyr or adwr. *Journal of Virology* 61 (10):3030-3034.
45. Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosewignjo R.I., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1988) Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *Journal of General Virology* 69:2575-2583.
46. Okamoto, H., Omi, S., Wang, Yu., Itoh, Y., Tsuda, F., Tanaka, T., Akahane, Y., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1989) The loss of subtypic determinants in alleles d/y or w/r, on hepatitis B surface antigen. *Molecular Immunology* 26(2):197-205.
47. Norder, H., Hammas, B., Lödfal, S., Couroucé, A.M. & Magnius, L.O. (1992) Comparison of aminoacid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *Journal of General Virology* 73:1201-1208.
48. Norder, H., Couroucé, A.M. & Magnius, L.O. (1992) Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes. *Journal of General Virology* 73:3141-3145.
49. Lerner, R., Green, N., Alexander, H., Fu-Tong, L., Sutcliffe, J.G. & Shinnick T.M. (1981) Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 78(6):3403-3407.
50. Dreesman, G., Sánchez, Y., Ionescu-Matiu, I., Sparrow, J.T., Six, H.R., Peterson, D.L., Hollinger, F.B. & Melnic, J.L. (1982) Antibody to hepatitis B surface antigen after a single inoculation of uncoupled synthetic HBsAg peptides. *Nature* 295:158-160.
51. Prince, A.M., Ikrham, H. & Hopp, T.P. (1982) Hepatitis B virus vaccine: Identification of HBsAg/a and HBsAg/d but not HBsAg/y subtype antigenic determinants on a synthetic immunogenic peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.

52. Bhatnagar, P.K., Papas, E., Blum, H.E., Milich, D.R., Nitecki, D., Karels, M.J. & Vyas, G.N. (1982) Immune response to synthetic peptide analogue of hepatitis B surface antigen specific for the a determinant. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79:4400-4404.
53. Neurath, A.R., Kent, S. & Strick, N. (1982) Specificity of antibodies elicited by a synthetic peptide having a sequence in common with a fragment of a virus protein, the hepatitis B surface antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 79:7871-7875.
54. Ionescu-Matiu, I., Kennedy, R., Sparrow, J.T., Culwell, A.L. Sánchez, Y., Melnick, J. & Dreesman, G.R. (1983) Epitopes associated with a synthetic hepatitis B surface antigen peptide. *The Journal of Immunology* 130(4):1947-1952.
55. Guering, J.L., Alexander, H., Wai-Kwo Shih, J., Purcell, R.H., Dapilito, G., Engle, R., Green, N., Sutcliffe, J.G., Shinnick, T.M. & Lerner, R.A. (1983) Chemically synthesized peptides of hepatitis B surface antigen duplicate the d/y specificities and induce subtype-specific antibodies in chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80:2365-2369.
56. Neurath, A.R., Kent, S.B.H. & Stirck, N. (1984) Antibody response to two synthetic peptides corresponding to residues 45-68 and 69-79 of the major protein of hepatitis B surface antigen. *Virus Research* 1:321-331.
57. Milich, D. R., Jones, J.E., McLachlan, Bitter, G., Moriarty, A. & Huges, J.L. (1990) Importance of subtype in the immune response to the pre-s(2) immunogen. II Synthetic pre-s(2) immunogen. *The Journal of immunology*:3544-3551.
58. Milich, D.R., Huges, J., McLachlan, A., Langley, K.E., Thornton, G.B. & Jones, J.E. (1990) Importance of subtype in the immune response to the pre-s(2) region of the hepatitis B surface antigen. I. T cell specificity. *The Journal of Immunology* 144(9):3535-3543.
59. Mimms, L.T., Floreani, M., Tyner, J., Whitters, E., Rosenlof R., Wray, L., Goetze, A., Sarin, V. & Eble, K. (1990) Discrimination of hepatitis B virus subtypes using monoclonal antibodies to the pre-s1 and pre-s2 domains of the viral envelope. *Virology* 176:604-619.
60. Coursaget, P., Lesage, G., Le cann, P., Mayelo, V. & Bourdil, C. (1991) Mapping of linear B-cell epitopes of hepatitis B surface antigen. *Research on Virology* 142:461-467
61. Waters, J.A., Brown, S., Steward, M.W., Howard, C.R. & Thomas, H.C. (1991) Analysis of the antigenic epitopes of hepatitis B surface antigen involved in the induction of a protective antibody response. *Virus Research* 22:1-12
62. MacKay, P., Pasek, M., Magazin, M., Kovacic, R.T., Allet, B., Stahl, S., Gilbert, W., Schaler, H., Bruce, S. & Murray, K. (1981) Production of immunologically

active surface antigens of hepatitis B virus in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 78(7):4510-4514

63. Peterson, D.L., Paul, D.A., Lam, J., Tribby, I.I.E & Achord, D. (1984) Antigenic structure of hepatitis B surface antigen: identification of the "d" subtype determinant by chemical modification and use of monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology* 132(2):920-927.

64. Wands, J.R. Wong, M.A., Shorey, J., Brown. R., Marciniak, R.A. & Isselbacher, K.J. (1984) Hepatitis B viral antigenic structure: signature analysis by monoclonal radioimmunoassays. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81:2237-2241.

65. Sa'adu, A., Bidwell, D., Lochniskar, M., Howard, C., Mc Adam, K.P.W.J. & Voller, A. (1991) Epitope mapping of HBsAg using a panel of human anti-HBs antibodies. *Journal of Virological Methods* 35:199-206.

66. Imai, M., Gotoh, A., Nishioka, K., Kurashina, S., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1974) Antigenicity of reduced and alkylated Australia antigen. *The Journal of Immunology* 112(1):416-419.

67. Neurath, A.R., Strick, N. & Oleszko, W.R. (1981) Localization of a Hepatitis B surface antigen determinant deduced from results of chemical modification. *Journal of Virological methods* 3:115.

68. Guerrero, E., Swenson, P.D., Hu, P. & Peterson, D.L. (1990) The antigenic structure of HBsAg: study of d/y subtype determinant by chemical modification and site directed mutagenesis. *Molecular immunology* 27(5):435-441.

69. Okamoto, H., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1987) Site-directed mutagenesis of hepatitis B surface antigen sequence at codon 160 from arginine to lysine for conversion of subtypic determinant from r to w. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 148(1):500-504.

70. Ashton-Rickardt, P.G. & Murray, K. (1989) Mutants of the hepatitis B virus surface antigen that define some antigenically essential residues in the immunodominant a region *Journal of Medical Virology* 29:196-203.

71. Ashton-Rickardt, P.G. & Murray, K. (1989) Mutants that change the immunological subtype of hepatitis B virus surface antigen and distinguish between antigenic and immunogenic determination. *Journal of Medical Virology* 29:204-214.

72. Kuroki, K., Floreani, M., Mimms, L.T. & Ganem, D. (1990) Epitope Mapping of the pre-S1 domain of the hepatitis B virus large surface protein. *Virology* 176:620-624.

73. Murphy, B.L., Maynard, J.E., Le Bouvier, G.L. (1974) Viral subtypes and cross protection in hepatitis B virus infection of chimpanzees. *Intervirology* :378-381.

74. Tachibana, K., Tanaka, T., Usuda, S., Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1989) Hepatitis B surface antigen with an excess or deficiency in subtypic determinants in sera from asymptomatic carriers in Japan. *Viral Immunology* 2 (1): 25-29.
75. Yamanaka, T., Akahane, Y., Suzuki, H., Okamoto, H., Tsuda, F., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1990) Hepatitis B surface antigen particles with all four subtypic determinants: point mutations of hepatitis B virus DNA inducing phenotypic changes or double infection with viruses of different subtypes. *Molecular Immunology* 27 5):443-449.
76. Celis, E., Ou, D. & Otvos, L. (1988) Identification of a major antigenic determinant of hepatitis B surface antigen for human T cells by means of synthetic peptides. in Zuckerman, A.J. ed.: *viral hepatitis and liver disease*. New York. Liss:650-655,
77. Chen, H.S., Howard, C.R. (1988) Properties and stability of the pre-S region of Hepatitis B Virus. in Zuckerman, A.J. ed.: *Viral Hepatitis and Liver Disease*. New York, Liss:606-613.
78. Holland, P.V., Purcell, R.H., Smith, H. & Alter, H. (1972) Subtyping of hepatitis-associated antigen (HBsAg) simplified technique with counterelectrophoresis. *The Journal of Immunology* 109(3):420-425.
79. Imai, M., Yamashita, Y., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1974) Hemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australia Antigen *Immunology* 27:871-878.
80. Miyakawa, Y., Imai, M., Mayumi, M. (1975) Application of the paired label radioantibody technique to detection and subtyping of hepatitis B surface antigen. *The Journal of Immunology* 114:1135-1137.
81. Hoofnagle, J.H., Gerety, M.D., L.A. Smallwood & L.F. Barker (1977) Subtyping of hepatitis B surface antigen and antibody by radioimmunoassay. *Gastroenterology* 72:290-296.
82. Usuda, S., Tsuda, F., Gotanda, T., Tachibana, K., Nomura, M., Okamoto, H., Imai, M., Nakamura, T., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1986) A solid-phase enzyme immunoassay for the common and subtypic determinants of hepatitis B surface antigen with monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 87:203-210.
83. Echevarría, J.M., León, P., Domingo, C.J., López, J.A., Echevarría, J.E., Contreras, G. & Fuertes, A. Characterization of HBV2-like infections in Spain. *Journal of Medical Virology* 33: 240-247.
84. Swenson, P.D., Riess, J.T. & Krueger, L.E. (1991) Determination of HBsAg subtypes in different high risk populations using monoclonal antibodies. *Journal of*

Virological Methods 33:27-38.

85. Norder, H., Hammas, B. & Magnius, O. (1990) Typing Hepatitis B Virus genomes by a simplified polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 31:215-221.

86. Norder, H., Hammas, B. & Magnius, L.O. (1990) Subtyping at the genomic level by site directed amplification. *Proceedings from the 1990 Viral Hepatitis. Houston.:* 195-199.

87. Nicholson, W.J., Black, S.H., Simmonds, P., Chung, C-W, Aw, D., & Peutherer. (1992) Comparison of Hepatitis B Virus subtyping of d/y determinants by radioimmunoprecipitation assay and the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 36:21-27.

88. Echevarría, J.E., Tenorio, A., Couroucé, A.M., León, P. & Echevarría, J.M. (1993) Polymerase chain reaction can resolve undefined cases of hepatitis B virus antigenic subtyping. *Journal of Medical Virology (en prensa)*.

89. Shih, J.W., Cheung, L., Alter, H.J., Lee, L.M. & Gu, J.R. (1991) Strain analysis of hepatitis B virus on the basis of restriction endonuclease analysis of polymerase chain reaction products. *Journal of Clinical Microbiology* 29(8):1640-1644.

90. Lin, H.J., Lai, Ch., Lauder, I.J., Wu, P., Lau, T.K. & Fong, M. (1991) Application of hepatitis B virus (HBV) DNA sequence polymorphisms to the study of HBV transmission. *The Journal of Infectious Diseases* 164:284-288.

91. Orito, E., Mizokami, M., Ina, Y., Moriyama, E.N., Kameshima, N., Yamamoto, M. & Gojobori, T. (1989) Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86:7059-7062.

92. Mazzur, S., Burgert, S., & Blumberg, B.S. (1974) Geographical distribution of Australia Antigen determinants d, y and w. *Nature* 247:38-40.

93. Sobêslabsky, O. (1980) Prevalence of markers of hepatitis B virus in various countries: a WHO collaborative study. *Bulletin of the World Health Organization* 58(4):621-628

94. Couroucé-Pauty, A.M., Plaçon, A. & Soulier, J.P. (1983) Distribution of HBsAg subtypes in the world. *Vox Sanguinis* 44:197-211.

95. Dodd, R.Y., Holland, P.V., Ni, L.Y., Smith, H.M. & Greenwalt, T.J. (1973) Hepatitis B antigen: regional variation in incidence and subtype ratio in the American red cross donor population. *American Journal of Epidemiology* 97(2):111-115

96. Skinhhog, P., McNair, A. & Andersen, S. (1974) Hepatitis and hepatitis B antigen in Greenland. *American Journal of Epidemiology* 99(1):50-57.

97. Yamashita, Y., Kurashina, S. & Miyakawa, Y. (1975) South to North gradient in distribution of the r determinant of hepatitis B surface antigen in Japan. *Journal of Infectious Diseases* 131:567-569.
98. Kamath, S. (1975) Hepatitis B surface antigen subtypes in Malaysia. *American Journal of Epidemiology* 102(2):191-195.
99. Bar-Shany, S., Edwards, V.M., Mosley, J.W. & Bancroft, W.H. (1973) Subtypes of hepatitis B e antigen among israeli blood donors. *Vox Sanguinis* 25:105-112.
100. Snitbahn, R., McNair, R., Bancroft, W.H., Top, F.H. & Chiewsilp, D. (1975) Subtypes of hepatitis B surface antigen in Southeast Asia. *The Journal of Infectious Diseases* 131(6):708-711.
101. Wenzel, R.P., Le Bouvier, G.L. & Beam, W.E. (1972) Drug abuse and viral hepatitis in Marines. *Journal of the American Medical Association* 220(5):707-709.
102. Nielsen, J.O. & Le Bouvier, G.L. (1973) Subtypes of australia antigen among patients and healthy carriers in Copenhagen *New England Journal of Medicine* 288:1257-1261.
103. Peters, C.J., Reeves, W.C., Holland, P.V. & Alter, H.J. (1974) Antigenic subtypes of hepatitis B antigen in Panama. *American Journal of epidemiology* 99(5):375-380.
104. Green, H.T. & Turner, G.C. (1975) Subtypes of hepatitis B antigen among patients and symptomless carriers. *Journal of Hyg. Camb.* 74:123-131.
105. Gust, I.D., Dimitrakakis, M. & Lucas, R. (1980) Changing patterns in the distribution of hepatitis B subtypes *Vox Sanguinis* 38:81-86.
106. Zuckerman, G.R., Hacker, E.J. & Aach, R.D. (1974) Epidemiological-clinical correlates of hepatitis B antigen subtypes. *Gastroenterology* 66:408-414.
107. Mosley, J.W., Edwards, V.M., Meihaus, J.E. & Redeker, A.G. (1972) Subdeterminants d and y of hepatitis B antigen as epidemiological markers. *American Journal of Epidemiology* 95(6):529-535.
108. Kashiwagi, S., Hayshi, J., Nomura, H., Ikematsu, H., Shingu, T., Hayashida, K., Yamashita, Y. & Kaji, M. (1983) Subtypes of hepatitis B surface antigen an familiar clusters of hepatitis B virus carriers. *American Journal of Epidemiology* 118(6):795-798.
109. Pons-Romero, F., Heathcote, J. & Sherlok, S. (1974) The epidemiological importance of ad and ay subtypes of the HB-Ag. *Gut*, 15:733-736

110. Powell, L.W., Halliday, J.W., Gera, K.L., McKeering, L. & Campbell, C.B. (1975) Hepatitis B antigen subtypes in Australia as detected by radioimmunoassay. *The American Journal of Gastroenterology* :127-133.
111. Pedreira, J., Guardia, J. Martínez-Vázquez, J.M. & Bacardí, R. (1975) Change of hepatitis B surface antigen in patients with hepatitis during a five years period. *The Journal of Infectious Diseases* 132(5):597-600.
112. Ukkonen, P., Koistien, V. & Penttinen, K. (1979) Anti-HBe and subtypes of HBsAg among asymptomatic HBsAg carriers. *Vox Sanguinis* 36:109-114.
113. Gerety, R.J., Hoofnagle, J.H., Nortman, D.F. & Barker, L.F. (1975) Hepatitis B surface antigen (HBsAg) subtypes and indices of clinical disease. *Gastroenterology* 68:1253-1260.
114. Le Bouvier, G. (1973) Subtypes of hepatitis B antigen: clinical relevance? *Annals of Internal Medicine* 79(6):894-896.
115. Nath, N., Fang, C.T., Ledman, R., Mazzur, S. & Dodd, R.Y. (1978) Relationship of subtypes of hepatitis B surface antigen with e antigen and its corresponding antibody. *The Journal of Infectious Diseases* 138(2):252-256.
116. Kanagawa, H., Takai, E., Tsuda, F., Machida, A., Kojima, M., Ishijima, A., Tanaka, T., Okamoto, H., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1992) Hepatitis B surface antigen particles of subtype adw and adr, and compound subtype (adwr) in symptom-free carriers in Japan. *Journal of medical Virology* 37:288-293
117. Carman, W & Thomas, H. (1992) Genetic variation in hepatitis B virus. *Gastroenterology* 102(2):711-719.
118. Carman, W., Thomas, H. & Domingo, E. (1993) Viral genetic variation: Hepatitis B Virus as a clinical example. *Lancet i*:349-353.
119. Brown, J., Carman, W.F. & Thomas, H. (1992) The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology* 15(1):145-148.
120. Nordenfelt, E. & Le Bouvier, G. (1973/74) Hepatitis B antigen with both d and y specificities in the same particles. *Intervirology* 2:65-74.
121. Mazzur, S., Burgert, S. & Le Bouvier, G. (1975) Compound d⁺y⁺ particles of Australia Antigen. *The Journal of Immunology* 114(5):1510-1512.
122. Tachibana, K., Tanaka, T., Usuda, S., Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1989) Hepatitis B surface antigen with an excess or deficiency in subtypic determinants in sera from asymptomatic carriers in Japan. *Viral Immunology* 2 (1): 25-29.

123. Paul, D., Purcell, R. & Peterson, D. (1986) Use of monoclonal antibodies to determine if HBsAg of mixed subtype is one particle or two. *Journal of Virological Methods* 13:43-53.
124. Maeland, A., Skaug, K., Storvold, G. & Kittelsen, P. (1989) Reactivation of hepatitis B virus. *Lancet i*:1083.
125. Zanetti, A.R., Panzi, E., Manzillo, G., Maio, G., Sbreglia, C., Camporaso, N., Thomas, H. & Zuckerman, A.J. (1988) Hepatitis B variant in Europe. *Lancet ii*: 1132.
126. Carman, W., Zanetti, A., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman, A.J. & Thomas, H. (1990) Vaccine escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet ii*: 325-329.
127. Harrison, T., Hopes, E.A., Oon, C.J., Zanetti, A. & Zuckerman, A. (1991) Independent emergence of a vaccine-induced scape mutant of Hepatitis B Virus. *Journal of Hepatology* 13(supp. 4):S105-S107.
128. Okamoto, H., Yano, K., Nozaki, Y., Matsui, A., Miyaki, H., Yamamoto, K., Tsuda, F., Machida, A. & Mishiro, S. (1992) Mutations within the S gene of Hepatitis B Virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immunoglobulin and vaccine. *Paediatric Research* 32(3):264-268.
129. Mc Mahon, G., Ehrlich, P.H., Moustafa, Z.A., McCarthy, L.A., Dottavio, D., Tolpin, M.D., Nadler, P.I. & Östberg, L. Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological assays of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients. *Hepatology* 15(5):757-766.
130. Moriyama, K., Nakajima, E., Hohjoh, H., Asayama, R. & Okochi, K. (1991) Immunoselected Hepatitis B Virus mutant. *Lancet i*:125.
131. Waters, J.A., Kenenedy, M., Voet, P., Hauser, P., Petre, J., Carman, W. & Thomas, H.C. (1992) Loss of the common "a" determinant of Hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *Journal of Clinical Investigation* 90:2543-2547.
132. Fernholz, D., Stemler, M., Brunetto, M., Bonino, F. & Will, H. (1991) Replicating and virion secreting hepatitis B mutant virus unable to produce pre-S2 protein. *Journal of Hepatology* 13(supp. 4):S102-S104.
133. Gerken, G., Kremsdorf, D., Capel, F., Petit, M.A., Dauget, C., Manns, M.P., Büschenfelde, K.M. & Brechot, C. Hepatitis defective virus with rearrangements in the pre-S gene during chronic HBV infection. *Virology* 183:555-565.
134. Santantonio, T., Jung, M.C., Schneider, R., Fernholz, D., Milella, M., Monno, L., Pastore, G., Pape, G.R. & Will, H. (1992) Hepatitis B virus genomes that cannot synthesize pre-s proteins occur frequently and as dominant virus populations in chronic carriers in Italy. *Virology* 188:948-952.

135. Guerken, G., Paterlini, P., Kremsdorf, D., Petit, M.A., Manns, M., Büschenfelde, K.M. & Brechot, C. (1992) Clinical significance of the polymerase chain reaction (PCR) assay in chronic HBV carriers. *Archives of Virology Supp.* 4:97-101.
136. Feitelson, M., Duan, L.-X., Horiike, N. & Clayton, M. (1991) Hepatitis B open reading frame deletion mutants isolated from atypical hepatitis B virus infections. *Journal of Hepatology* 13(supp. 4):S58-S60.
137. Repp, R., Keller, C., Borkhardt, A., Csecke, A., Schaefer, S., Gerlich, W.H., & Lampert, F. (1992) Detection of hepatitis B virus variant with a truncated X gene and enhancer II. *Archives of Virology* 125:299-304.
138. Coursaget, P., Ivonnet, Bourdil, C., Mevelec, M.N., Adamovicz, P., Barres, J.L., Chotard, J., N'Doye, R., Diop Mar, I. & Chiron, J.P. (1987) HBsAg positive reactivity in man not due to hepatitis B virus. *Lancet ii*: 1354-1358.
139. Redeker, A.G., Govindarajan, S. (1988) Possible case of HBV-2 infection. *Lancet i*: 656.
140. Wu, J-S, Ko, Y.C. & Liu, W-T (1988) Hepatitis B virus type 2. *Lancet i*: 990.
141. Romieu, I., Sow, I., Lu S., Laroque, G., Prince-David, M., Rommet-Lemone J.L. (1989) Prevalence of Hepatitis B markers among hospital workers in Senegal. *Journal of medical Virology* 33:240-247.
142. Vranckx, R., Muylle, L. & Meheus, A. (1989) Hepatitis B core antibody-negative HBsAg carriers. *Infection* 17 (4): 250-251.
143. Tagariello, G., Traldi, A., Cavaletto, M.D., Pontisso, M.D. & Alberti, A. (1989) Hepatitis B virus type 2 in Italian hemophiliacs. *Transfusion* 29 (6): 559.
144. Buisson, Y., Coursaget, P., Bourdil, C., Schill, H., Joussement, M., Molinié, C. (1990) Hepatitis B Virus type 2 infection in France. *Research in Virology* 141:365-371.
145. Echevarría, J.M., León, P., Domingo, C.J., & López, J.A. (1988) Atypical hepatitis B virus in Spain? *Lancet ii*: 1315.
146. Echevarría, J.E., Leon, P., Domingo, C.J., López, J.A., Echevarría, J.E., Contreras, C. & Fuertes, A. (1990) Characterization of HBV-2 like infections in Spain. *Journal of Medical Virology* 33:240-247.
147. Wands, J., Fujita, Y., Isselbacher, K.J., Degott, C., Schellekens, H., Dazza, M.C., Thiers, V., Tiollais, P. & Brechot, C. (1986) Identification and transmission of hepatitis B virus related variants. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 83:6608-6612.

148. Liang, T.J., Isselbacher, K.J. & Wands, J.R. (1989) Rapid identification of low level Hepatitis B-related viral genome in serum. *Journal of Clinical Investigation* 84:1367-1371.
149. Zeldis, J.B., Lee, H.J., Mamish, D., Finegold, D.J., Sircar, R., Ling, Q., Knudsen, P.J., Kuramoto, I.K., Mimms, L.T. (1989) Direct method for detecting small quantities of hepatitis B virus DNA in serum and plasma using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Investigation* 84:1503-1508.
150. Lee, S.-D., Lo, K.-L., Tsai, Y.T., Wu, J.-C. & Wu, T.-C. (1989) HBsAg carrier infants with serum anti-HBc negativity. *Hepatology* 9(1):102-104.
151. Möller, B., Hopf, U., Stemerowicz, R., Henze, G. & Gelderblom (1989) HBcAg expressed on the surface of circulating Dane particles in patients with Hepatitis B Virus infection without evidence of anti-HBc formation. *Hepatology* 10(2):179-185.
152. Melegari, M., Jung, M.C., Schneider, R., Santantonio, T., Bagnulo, S., Luchena, N., Pastore, G., Pape, G., Scaglioni, P.P., Villa, E. & Will, H. (1991) Conserved core protein sequences in Hepatitis B Virus infected patients without anti-HBc. *Journal of Hepatology* 13:187-191.
153. Lee, J.-H., Paglieroni, T., Holland, P.V. & Zeldis, J.B. (1992) Chronic Hepatitis B Virus infection in an anti-HBc nonreactive blood donor: variant virus or defective immune response? *Hepatology* 16(1):24-30.
154. Benito, R., Larrad, L., Lasierra, M.P., Ferrer, I., Sánchez, R. & Benito, J. (1988) Presencia simultánea de HBsAg y anti-HBs en el mismo suero: frecuencia y posibles causas. *Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica* 6(1):33-36.
155. Couroucé-Pauty, A.M. & Holland, P.V. (1978) Summary of workshop A-2: HBsAg and its subtypes. in Vyas, Cohen, Schmidt, *Viral Hepatitis*. The Franklin Institute Press:649-654.
156. Le Bouvier, G., Capper, R.A., Williams, A.E., Pelletier, M. & Katz, A.J. (1976) Concurrently circulating hepatitis B surface antigen and heterotypic anti-HBs antibody. *The Journal of Immunology* 117(6):2262-2264.
157. Koziol, D.E., Alter, H., Kirchner, J.P. & Holland, P.V. (1976) The development of HBsAg-positive hepatitis despite the previous existence of antibody to HBsAg. *The Journal of Immunology* 117(6):2260-2261.
158. Sasaki, T., Ohkubo, Y., Yamashita, Y., Imai, M., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1976) Co-occurrence of Hepatitis B surface antigen of a particular subtype and antibody to a heterologous subtypic specificity in the same serum. *The Journal of Immunology* 117(6):2258-2259.
159. Tabor, E., Gerety, R., Smallwood, L.A. & Barker, L. (1977) Coincident hepatitis B surface antigen and antibodies of different subtypes in human serum. *The Journal of Immunology* 118(1):369-370.

160. Heitjink, R.A., Van Hattum, J., Schalm, S.W. & Masurel, N. (1982) Co-occurrence of HBsAg and anti-HBs: Two consecutive infections or a sign of advanced chronic liver disease? *Journal of Medical virology* 10:83-90.
161. Foutch, P.G., Carey, W.D., Tabor, E., Cianflocco, A.J., Nakamoto, S., Smallwood, L.A. & Gerety, R.J. (1983) Concomitant Hepatitis B surface antigen and antibody in thirteen patients. *Annals of Internal Medicine* 99:460-463.
162. Swenson, P.D., Escobar, M., Carithers, R.L. & Sobieski, T.J. (1983) Failure of preexisting antibody against Hepatitis B surface antigen to prevent subsequent Hepatitis B infection. *Journal of Clinical Microbiology* 18(2):305-309.
163. Tabor, E., Gerety, R.J., Smallwood, L.A. & Barker, L.F. (1976) Induction of antibody to the "y" determinant of HBsAg in a chimpanzee carrier of HBsAg subtype "adw". *Journal of Immunology* 117:2038-2040.
164. Leibowitz, M.D. & Vladotiu, A.O. (1984) Concomitant Hepatitis B surface antigen and antibody. *Annals of Internal Medicine* 100:615
165. Shereretz, R.J. & Spindel, E (1983) Antibody to hepatitis b surface antigen may not always indicate immunity to Hepatitis B Virus infection. *The New England Journal of Medicine* 309(24):1519.
166. Linneman, C.C. & Askey, P.A. (1984) Susceptibility to Hepatitis B despite high titre anti-HBs antibody. *The Lancet* i:346-347.
167. Wang, Y.-J., Lee, S.-D., Wu, J.-Ch. & Lo, K.-J. (1991) Acute Hepatitis B viral infection in a patient with anti-HBs. *Journal of Medical Virology* 35:133-135.
168. Brotman, B. & Prince, A.M. (1984) Occurrence of AUSAB test positivity unrelated to prior exposure to Hepatitis B Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 150(5):714-720.
169. Hoofnagle, J.H., Schafer, D.F., Ferenci, P., Waggoner, J.G., Vergalla, J., April, M. & Philips, L. (1983) Antibody to Hepatitis B surface antigen in nonprimate animal species. *Gastroenterology* 84:1478-1482.
170. Millman, I. & Mc Michael, J.C. Glycoproteins of natural origin with an affinity for Hepatitis B surface antigen. *Infection and Immunity* 21(3):879-885.
171. León, P., López, J.A., Contreras, G. & Echevarría, J.M. (1988) Antibodies to Hepatitis Delta Virus in intravenous drug addicts and male homosexuals in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 7:533-535.
172. Draelos, M., Morgan, T., schifman, R.B. & Sampliner, R.E. (1987) Significance of isolated antibody to Hepatitis B core antigen determined by the immune response to Hepatitis b vaccination. *Journal of the American Medical Association* 258:1193-1195.

173. Sumazaki, R., Motz, M., Wolf, H., Heinig J., Jilg, W. & Deinhard, F. (1989) detection of Hepatitis B Virus in serum using amplification of viral DNA by means of the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 27:304-308.
174. Caspari, G., Beyer, H.-J., Elbert, G., Koerner, K., Muss, P., Schunter, F.W., Uy, A., Gerlich, W., Thomssen, R. & Schmitt, H. (1989) Unsatisfactory specificities and sensitivities of six enzyme immunoassays for antibody to Hepatitis B core antigen. *Journal of Clinical Microbiology* (1989):2067-2072.
175. Pedreira, J., Martínez, J.M., Guardia, J., Pahissa, A., Gallart, M.T., Hernández, J.M., Bacardí, R. & Tornos, J. (1974) HBsAg subtypes in Spain. *Lancet* i:98.
176. Galibert F, Mandart E, Fitoussi F, Tiollais P, Charnay P (1979) Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. Coli*. *Nature*, 281:646-650.
177. Sumazaki R, Motz M, Wolf H, Heining J, Jilg W, Deinhard F (1989) Detection of Hepatitis B Virus in serum using amplification of viral DNA by means of the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Virology* 27:304-308.
178. Orito, E., Mizokami, M., Ina, Y., moriyama, E.N., Kameshima, N., Yamamoto, M. & gojobori, T. (1989) Host-independent evolution and a genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.
179. Rho HM, Kim K, Hyun SW, Kim YS (1989) The nucleotide sequence and reading frames of a mutant hepatitis B virus subtype adr. *Nucleic Acids Research* 17(5):2124.
180. Kaneko S, Feinstone SM, Miller RH (1989) Rapid and sensitive method for the detection of serum Hepatitis B Virus DNA using the polymerase chain reaction technique. *Journal of Clinical Microbiology* 27 (9):1930-1933.
181. Kwok S, Kellog DE, Mckinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C., Sninsky JJ (1990) Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: Human Immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research* 18 (4):999-1005.
182. Norkrans, G., Magnius, L.O., Schaefer, R.A. & Prince, A.M. (1976). e-antigen in acute hepatitis B. *British Medical Journal* 1:740-742.
183. León, P., López, J.A., Contreras, G. & Echevarría, J.M. (1988) Antibodies to Hepatitis Delta Virus in intravenous drug addicts and male homosexual in Spain. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 7:533-535.