



# Estudio de la replicación del virus de la hepatitis B e infección por otros virus hepatotropos en pacientes con infección crónica por el virus B

M. Buti, X. Costa\*, A. Valdés, M. Cotrina\*, F. Rodríguez Frías\*, R. Jardí\*, R. Esteban y J. Guardia

Servicio de Hepatología. Laboratorio de Bioquímica. \*Hospital General Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.

## RESUMEN

**FUNDAMENTO:** Estudiar la replicación del virus de la hepatitis B (VHB) en una serie de pacientes con infección por el VHB y analizar la frecuencia de infección asociada por los virus de la hepatitis C (VHC) y D (VHD).

**PACIENTES Y MÉTODO:** Se han estudiado en una muestra de suero perteneciente a 463 pacientes con infección crónica por el VHB los marcadores serológicos del VHB, VHC y VHD, los valores de transaminasas y el ADN del VHB.

**RESULTADOS:** Trescientos noventa y seis (85,5%) fueron catalogados como hepatitis B, 33 (7,1%) como hepatitis B y C, 17 (3,6%) como hepatitis B y D y 17 (3,6%) como hepatitis B, C y D. El 67% de los pacientes con hepatitis B eran portadores asintomáticos del HBsAg, y el 33%, hepatitis crónicas B. El ADN del VHB se identificó en el 27,7% de las hepatitis B, en el 24% de las hepatitis B y C, en el 11,7% de las hepatitis B y D, y en el 29,4% de las hepatitis B, C y D. El ADN del VHB era positivo y las transaminasas estaban elevadas en el 63% de los casos HBeAg positivo y solamente en el 16% de los anti-HBe, por lo que éstos se consideraron candidatos a tratamiento antiviral.

**CONCLUSIONES:** En nuestro medio, la mayoría de los pacientes con infección por el VHB son portadores asintomáticos del HBsAg. En el 22% de los casos se detecta replicación viral y presentan valores de ALT elevados; por tanto, son candidatos a tratamiento antiviral. Entre el 3,6 y el 7,1% de las hepatitis B presentan coinfección por el VHC, VHD o ambos, sin que se observen diferencias significativas en la replicación del VHB entre los distintos grupos.

## STUDY OF HEPATITIS B VIRUS REPLICATION AND INFECTION BY OTHER HEPATITIS VIRUSES IN PATIENTS WITH CHRONIC HEPATITIS B VIRUS INFECTION

**AIM:** To study hepatitis B virus (HBV) replication in a series of patients with HBV infection and to analyze the frequency of associated hepatitis C virus (HCV) and hepatitis D (HDV) infection.

**PATIENTS AND METHOD:** Serological markers of HBV, HCV and HDV, transaminase values and HBV DNA were studied in serum samples from 463 patients with chronic HBV infection.

**RESULTS:** Three hundred ninety-six (85.5%) were classified as hepatitis B, 33 (7.1%) as hepatitis B and C, 17 (3.6%) as hepatitis B and D and 17 (3.6%) as hepatitis B, C and D. Sixty-seven percent of patients with hepatitis B and 33% of those with chronic hepatitis B were asymptomatic HBsAg carriers. HBV DNA was identified in 27.7% of patients with hepatitis B, in 24% of those with hepatitis B and C, in 11.7% of those with hepatitis B and D and in 29.4% of those with hepatitis B, C and D. HBV DNA and elevated transaminase levels were found in 63% of HBeAg-positive patients and in only 16% of those who were anti-HBe-positive. These latter were considered candidates for antiviral treatment.

**CONCLUSIONS:** In our environment, most patients with HBV infection are asymptomatic HBsAg carriers. Viral replication and elevated alanine aminotransferase levels were found in 22% of the patients. Consequently, these patients are candidates for antiviral treatment. Between 3.6% and 7.1% of patients with hepatitis B presented coinfection with HCV or HDV, or both. No significant differences were found in HBV replication among the different groups.

## INTRODUCCIÓN

La hepatitis B es un problema de salud pública importante, ya que existen en el mundo más de 300 millones de portadores crónicos del virus de la hepatitis B (VHB), lo que supone aproximadamente el 5% de la población mundial<sup>1,2</sup>.

X. Costa disfrutó de una beca de Bristol-Myers Squibb para la realización de este estudio. El trabajo ha sido financiado en parte por una beca del Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS 00/079).

Correspondencia: Dra. M. Buti.

Servicio de Hepatología. Hospital General Universitario Vall d'Hebron.  
Paseo Vall d'Hebron, 117. 08035 Barcelona.  
Correo electrónico: mbuti@hg.vhebron.es

Recibido el 17-5-2001; aceptado para su publicación el 22-11-2001.

La distribución de la infección por el VHB es universal y variable, con una mayor prevalencia de portadores crónicos del antígeno de superficie (HBsAg) del VHB en el sudeste asiático y en África, donde en algunas áreas más del 10% de la población es portadora del HBsAg<sup>3-5</sup>. En España, la prevalencia de la infección por el VHB es baja, aproximadamente el 1% de la población, y la infección crónica por el VHB representa la segunda causa de hepatitis crónica de etiología vírica en adultos en nuestro medio, después de la hepatitis C<sup>6</sup>.

Los pacientes portadores de HBsAg son el principal reservorio de la infección. Ésta se transmite por diferentes vías, siendo la parenteral la más importante.

Otras vías de transmisión de la infección son la sexual y la transmisión vertical. Los portadores crónicos del VHB con evidencia de replicación viral, es decir, con antígeno «e» (HBeAg) y ADN del VHB positivo, son los que transmiten más a menudo la infección y los que presentan un riesgo más elevado de desarrollar una enfermedad hepática progresiva<sup>3-5</sup>.

En las últimas décadas la implementación de programas de vacunación masiva de recién nacidos y adolescentes frente al VHB ha conseguido disminuir el número de infecciones nuevas por este virus<sup>6,7</sup>. Asimismo el tratamiento antiviral ha permitido disminuir la infecciosidad de los pacientes con hepatitis crónica B<sup>6,7</sup>. Los nuevos antivirales de administración oral como la lamivudina, con una buena tolerancia y un perfil de seguridad superior a los interferones, van a posibilitar el tratamiento de un mayor número de pacientes con hepatitis crónica B<sup>8-10</sup>. Por tanto, en el momento actual es importante el reconocimiento y el diagnóstico de esta infección, ya que existen nuevas posibilidades terapéuticas.

El objetivo de este trabajo ha sido analizar de forma prospectiva: *a)* la replicación del VHB en una serie de pacientes HBsAg positivo; *b)* catalogar a los pacientes con infección crónica por el VHB en portadores asintomáticos del HBsAg y en hepatitis crónica B, atendiendo a criterios bioquímicos, y *c)* conocer la frecuencia de infección simultánea por los virus de la hepatitis C (VHC) y D (VHD) en estos pacientes.

## PACIENTES Y MÉTODO

Se ha estudiado de forma prospectiva a todos los pacientes HBsAg positivo atendidos en un servicio de hepatología durante el período de un año, de enero a diciembre de 1999. En todos los casos se disponía de una muestra de suero para la determinación de los valores de alaninoaminotransferasa (ALT), HBsAg, antígeno e (HBeAg), ADN-VHB, anticuerpos frente al VHC (anti-VHC) y anticuerpos frente al virus de la he-

patitis delta (anti-VHD). El diagnóstico de hepatitis crónica por el VHB se realizó por la positividad de HBsAg y la elevación persistente de los valores de ALT durante un período superior a 6 meses, y/o la presencia de lesión hepática demostrada histológicamente. El diagnóstico de portador asintomático del VHB se basó en la positividad del HBsAg y en la normalidad de las pruebas de función hepática en dos o más determinaciones separadas por un intervalo superior a 6 meses. El diagnóstico de infección por VHB y VHC se basó en la detección simultánea de HBsAg y anti-VHC; el de infección por VHB y VHD, por la presencia de HBsAg y anti-VHD, y el de infección por VHB, VHC y VHD, por la presencia de HBsAg, anti-VHC y anti-VHD.

## Marcadores serológicos

Las determinaciones de HBsAg, anti-VHC y anti-HBc-IgM se realizaron por técnicas de inmunoensayo (HBsAg, anti-VHC, anti-HBc-IgM, Johnson & Johnson, Rochester, EE.UU.). El HBeAg, los anticuerpos anti-HBe y anti-VHD se detectaron mediante técnicas de radioinmunoensayo (Abbott HBe y Anti-delta. Abbott Laboratories, North Chicago, IL, EE.UU.).

El ADN-VHB se determinó en muestras de suero congeladas mediante una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simple cualitativa, descrita previamente<sup>11</sup>. La sensibilidad del método es aproximadamente de 700.000 copias de ADN-VHB/ml. La especificidad de la técnica se comprobó mediante una doble PCR<sup>11</sup>.

## Análisis estadístico

Para la comparación de los resultados cualitativos se han utilizado los tests exacto de Fisher y de la  $\chi^2$ . La comparación de variables cuantitativas se llevó a cabo utilizando los tests no paramétricos de la U de Mann-Whitney y la H de Kruskal-Wallis. El programa SPSS (Chicago, IL EE.UU., versión 75) fue utilizado para el análisis estadístico de los resultados. Los valores de  $p < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## RESULTADOS

De los 463 pacientes HBsAg positivo, 396 (85,5%) fueron catalogados como hepatitis B, 33 (7,1%) como hepatitis B y C, 17 (3,7%) como hepatitis B y D y 17 (3,7%) como hepatitis B, C y D.

De los 396 pacientes con infección por el VHB, 131 (33%) correspondían a hepatitis crónicas y 265 (67%) a portadores asintomáticos del VHB. El HBeAg fue positivo en 49 casos (12,3%), los anticuerpos anti-HBe en 340 (86%), y ambos fueron negativos en 7 casos (1,7%). El ADN del VHB fue positivo en el 88% de los casos HBeAg positivo y el 19,4% de los casos anti-HBe positivo (tabla I). Ochenta y seis (65,6%) de las 131 hepatitis crónicas B con valores de ALT elevados presentaban ADN-VHB positivo; por tanto, eran candidatas a tratamiento antiviral.

De los 33 pacientes con hepatitis B y C, 6 (18%) eran HBeAg positivo, y 27 (82%) anti-HBe positivo. De los 23 pacientes con valores de ALT elevados, el ADN-VHB

TABLA I. Marcadores serológicos del virus de la hepatitis B (VHB), valores de transaminasas y ADN del VHB en las infecciones crónicas B

Marcadores VHB	N.º de casos	N.º de casos ADN-VHB positivo (%)	N.º de casos ALT elevada (%)	ALT UI/l Mediana (rango)	N.º de casos ADN-VHB positivo/ALT elevada (%)
HBe Ag+	49	43 (88%)	34 (69%)	81 (38-667)	31 (63%)
Anti-HBe+	340	66 (19,4%)	93 (27%)	72 (34-801)	54 (16%)
HBeAg-	7	1 (14,2%)	4 (57%)	58 (48-250)	1 (14,2%)
Anti-HBe-					
Total	396	110 (27,7%)	131 (33%)	73 (34-801)	86 (22%)

TABLA II. Marcadores serológicos de hepatitis B, resultados del ADN-VHB y valores de transaminasas en la hepatitis B y C

Marcadores VHB	N.º de casos	N.º de casos ADN-VHB positivo (%)	N.º de casos ALT elevada (%)	ALT UI/I Mediana (rango)	N.º de casos ADN-VHB positivo/ALT elevada
HBeAg+	6	5 (83%)	6 (100%)	130 (54-220)	5 (83%)
Anti-HBe+	27	3 (11%)	17 (63%)	79 (39-190)	2 (7,4%)
Total	33	8 (24%)	23 (70%)	73 (39-220)	7 (21%)

TABLA III. Marcadores serológicos del virus de la hepatitis B (VHB), resultados del ADN-VHB y valores de transaminasas en las hepatitis B y D

Marcadores VHB	N.º de casos	N.º de casos DNA-VHB positivo (%)	N.º de casos ALT elevada (%)	ALT UI/I Mediana (rango)	N.º de casos ADN-VHB positivo/ALT elevada
HBe Ag+	1	0	1 (100%)	53	0
Anti-HBe+	12	1 (8,3%)	9 (75%)	64 (36-163)	0
HBe Ag-	4	1 (25%)	4 (100%)	72 (55-250)	1 (25%)
Anti-HBe-					
Total	17	2 (11,7%)	14 (82,3%)	62 (36-250)	1 (6%)

TABLA IV. Marcadores serológicos del virus de la hepatitis B (VHB), resultados del ADN-VHB y valores de transaminasas en la hepatitis B, C y D

Marcadores VHB	N.º de casos	N.º de casos ADN-VHB positivo (%)	N.º de casos ALT elevada (%)	ALT UI/I Mediana (rango)	N.º de casos ADN-VHB positivo/ALT elevada
HBe Ag+	2	2 (100%)	2 (100%)	177 (175-178)	2 (100%)
Anti-HBe+	12	2 (16,6%)	12 (100%)	81 (60-153)	2 (16,6%)
HBeAg-	3	1 (33,3%)	2 (66,6%)	79 (58-100)	1 (33,3%)
Anti-HBe-					
Total	17	5 (29,4%)	16 (94%)	84 (58-178)	5 (29,4%)

fue positivo en 7 (30,4%). En la tabla II se indican los resultados de la detección del ADN-VHB y los valores de ALT en este grupo de pacientes.

De los 17 pacientes con hepatitis B y D, sólo uno (6%) era HBeAg positivo, 12 (70,5%) eran anti-HBe positivo y 4 (23,5%) eran HBeAg y anti-HBe negativos. El ADN-VHB se detectó solamente en dos casos (11,7%) y los valores de ALT estaban elevados en 14 (82,3%) (tabla III). Solamente uno (7%) de los 14 pacientes con hepatitis B y D presentaba simultáneamente concentraciones de ALT elevadas y ADN-VHB positivo.

De los 17 casos con hepatitis B, C y D, el HBeAg se detectó en dos casos (11,7%), los anticuerpos anti-HBe en 12 (70,5%) y ambos fueron negativos en tres casos (17,6%) (tabla IV). Los valores de ALT estaban elevados en 16 casos (94%) y se detectó simultáneamente en el suero ADN-VHB en 5 pacientes (29,4%). Globalmente el ADN-VHB se identificó en el 27,7% de las hepatitis B, en el 24% de las hepatitis B y C, en el 11,7% de las hepatitis B y D, y en el 29,4% de las hepatitis B, C y D, sin que se observaran diferencias significativas entre los distintos grupos. Sin embargo, al analizar a los pacientes con valores de ALT elevados, el ADN-VHB se identificó en 86 (65,6%) de 131 casos con hepatitis B frente al 30% de las hepatitis B y C ( $p = 0,001$ ), el 7% de las hepatitis B y D ( $p > 0,001$ ) y el 31% de las hepatitis B, C y D ( $p = 0,007$ ).

El análisis de las características epidemiológicas demostró que la mayoría de los casos eran varones ( $p < 0,05$ ).

TABLA V. Características epidemiológicas de los distintos grupos

	VHB	VHB + VHC	VHB + VHD	VHB + VHC + VHD
N.º de casos	396	33	17	17
Edad, media (años)	47 ± 14	51 ± 16	38 ± 8*	41 ± 7
Varones	278 (70,2%)	25 (75,7%)	13 (76,4%)	12 (70,5%)
Vía de transmisión				
Sexual	10 (2,5%)	—	1 (5,8%)	—
ADVP	34 (8,6%)	9 (33,3%)	9 (53%)	14 (82,3%)
Transfusiones	11 (2,8%)	10 (30,3%)	1 (5,8%)	1 (5,8%)
Desconocida	341 (86,1%)	12 (36,4%)	6 (35,4%)	2 (11,9%)

VHB: virus de la hepatitis B; VHC: virus de la hepatitis C; VHD: virus de la hepatitis D; ADVP: adicción a drogas por vía parenteral. \* $p < 0,05$  en relación con los otros grupos.

La edad media de los pacientes con hepatitis B y D fue significativamente inferior a la de los pacientes con hepatitis B o B y C ( $p < 0,05$ ). No se identificaron factores de riesgo en más de la mitad de los casos de riesgo. El antecedente de transfusión sanguínea fue más frecuente en las hepatitis B y C, y el de adicción a drogas por vía intravenosa en las hepatitis B, C y D (tabla V).

## DISCUSIÓN

En este estudio se observó que la mayoría de los pacientes HBsAg positivo eran portadores asintomáticos del VHB y solamente un 33% presentaba una hepatitis crónica. La infección asociada por el VHC fue relativamente frecuente,

constatándose en el 7% de los pacientes HBsAg positivo y elevándose hasta el 25% si se analizaba únicamente a los pacientes con hepatitis crónica B. La elevada asociación entre las dos infecciones ya se ha mencionado en otras series publicadas<sup>12-14</sup> y es debida a que ambas comparten la misma vía de transmisión. Además, 67 (17 hepatitis B y D, 17 hepatitis B, C y D y 33 hepatitis B y C) de las 131, es decir el 51% de las hepatitis crónicas B, presentaban infección asociada por el VHC o VHD, aspecto importante en la valoración y selección del tratamiento antiviral. La infección por el VHD en nuestro medio ha descendido en las últimas décadas al igual que ha ocurrido en otros países<sup>15,16</sup>. En la actualidad es alrededor de un 4%, mientras que en la década de los ochenta en el 5% de los pacientes con hepatitis crónica B sin factores de riesgo y en el 70% de las hepatitis crónicas B en adictos a drogas por vía parenteral existía coinfeción por el VHD<sup>17</sup>. La asociación de infección por VHB y VHC o VHD se acompañó de forma invariable de enfermedad hepática crónica, no observándose en portadores sanos del VHB. Un aspecto importante y de especial trascendencia para el tratamiento es que la mayoría de las hepatitis crónicas, el 86% en nuestro medio, son anti-HBe positivo, y de ellas solamente un 16% presentan ADN-VHB positivo y valores de ALT elevados, y por tanto reúnen criterios de tratamiento. La técnica que se utilizó para determinar el ADN-VHB fue una PCR simple con un límite inferior de sensibilidad de 700.000 copias/ml. Esta técnica tiene una sensibilidad similar a los tests de hibridación molecular que poseen un límite inferior de sensibilidad que oscila entre  $10^5$  y  $10^6$  copias/ml. Estos tests son los utilizados en la mayoría de los estudios multicéntricos para seleccionar a los candidatos a tratamiento antiviral. Existen otras técnicas de doble PCR, más sensibles, capaces de detectar entre 100-1.000 copias virales/ml. La elevada sensibilidad de estas técnicas permite detectar viremia en una elevada proporción de pacientes con hepatitis crónica B e incluso en portadores del VHB sin enfermedad hepática aparente. Todas ellas tienen limitaciones en su estandarización y en algunos países no están aprobadas. Recientemente la conferencia de consenso sobre el VHB recomienda utilizar como criterios para el tratamiento de los pacientes con hepatitis crónica B la elevación de las transaminasas, la presencia de HBeAg y/o valores de ADN superiores a 100.000 copias/ml y una histología hepática que evidencie lesiones de actividad inflamatoria moderada y fibrosis<sup>18</sup>. En los pacientes con hepatitis crónica B, C y/o D, la distribución del HBeAg y anti-HBe es similar a la observada en las hepatitis B aisladas. Sin embargo, al analizar la positividad del ADN-VHB, los pacientes con hepatitis B y D son los que presentan un porcentaje más bajo de replicación viral, comprobándose una vez más el efecto que ejerce el VHD inhibiendo la replicación del

VHB<sup>19</sup>. El porcentaje de pacientes candidatos a tratamiento en cada grupo es similar, a excepción de las hepatitis B y D. En resumen, entre el 6 y el 29% de los pacientes con hepatitis crónica B aislada o asociada a otros virus presentan valores de ALT elevados y viremia, por lo que pueden beneficiarse del tratamiento antiviral.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Alter MJ, Mast EE. The epidemiology of viral hepatitis in the United States. *Gastroenterol Clin North Am* 1994;23:437-55.
2. Kane M. Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine* 1995;13:S47-S9.
3. Look AS. Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *J Hepatol* 2000;32:89-97.
4. William ML. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337:1733-45.
5. Hoofnagle JH. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1990; 323:337-9.
6. Salleras L, Plans P, Vidal J, Domínguez-García A, Navas E, Urbitzondo L, et al. Serological evaluation of universal vaccination programme of pre-adolescents in Catalonia (Spain). *Vacunas* 2000;1:3-6.
7. Stroffolini T, Mele A, Tosti ME, Gallo G, Balocchini E, Ragni P, et al. The impact of the hepatitis B mass immunisation campaign on the incidence and risk factors of acute hepatitis B in Italy. *J Hepatol* 2000;33:980-5.
8. Dienstag J, Perrillo RP, Schiff ER, Bartholomew M, Vicary C, Rubin M. A preliminary study of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *N Engl J Med* 1995;333:1657-61.
9. Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Crian R, Tai DI. A one-year of lamivudine for chronic hepatitis B. *Asia Lamivudine Study Group. N Engl J Med* 1998;339:61-8.
10. Zoulin F, Trepo C. Drug therapy for chronic hepatitis B: antiviral efficacy and influence of hepatitis B virus polymerase mutations on the outcome of therapy. *J Hepatol* 1998;29:151-68.
11. Rodriguez F, Buti M, Jardí R, Cotrina M, Viladomiu L, Esteban R, et al. Hepatitis B virus infection. Precore mutants and its relation to viral genotypes. *Hepatology* 1995;22:1461-7.
12. Liaw YF. Role of hepatitis C virus in dual and triple hepatitis virus infection. *Hepatology* 1995;22:1101-7.
13. Crespo J, Lozano JL, Carte B, Heras B, Cruz F, Pons Romero F. Viral replication in patients with concomitant hepatitis B and C virus infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16:445-51.
14. Gaeta GB, Stroffolini T, Chiaramonte M, Ascione T, Stornaiuolo G, Lobello S, et al. Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian Multicenter Study. *Hepatology* 2000;32:824-7.
15. Navascués CA, Rodríguez M, Sotorrio NG, Sala P, Linares A, Suárez A, et al. Epidemiology of hepatitis D infection: changes in the last 14 years. *Am J Gastroenterol* 1995;11:1981-4.
16. Buti M, Esteban R, Jardí R, Allende H, Baselga JM, Guardia J. Epidemiology of Delta infection in Spain. *J Med Virol* 1988; 26:327-32.
17. Sagnelli E, Coppola N, Scolastico C, Filippini P, Santantonio T, Stroffolini T, et al. Virologic and clinical expressions of reciprocal inhibitory effect of hepatitis B, C, and delta viruses in patients with chronic hepatitis. *Hepatology* 2000;32:1106-10.
18. Lok A, Heathcote J, Hoofnagle J. Management of hepatitis B: 2000-Summary of a Workshop. *Gastroenterology* 2001;120: 1828-53.
19. CDC Update. Universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B, and other blood borne pathogens in health-care settings. *MMWR* 1988; 36:377-88.