



UNIVERSIDAD  
COLEGIO MAYOR  
DE CUNDINAMARCA

**ACUERDO No. 034**

( 21 OCT. 1997 )

Por el cual se aprueba el proyecto de investigación Evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna recombinante anti-hepatitis B HEPRECOMB Berna en adultos sanos.

EL CONSEJO ACADEMICO DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA en uso de sus facultades legales y en especial de las que le confiere el Artículo 27 del Acuerdo No. 001 del 27 de mayo de 1986, expedido por el Consejo Superior Universitario

**CONSIDERANDO:**

Que la Vicerrectora Académica de la Universidad presentó el proyecto de investigación previamente revisado por la división de investigaciones.

Que el proyecto se enmarca en las líneas de investigación definidas por la Universidad

**ACUERDA:**

**ARTICULO PRIMERO.- APROBAR** el proyecto de investigación Evaluación de la inmunogenicidad de la vacuna recombinante anti-hepatitis B HEPRECOMB Berna® en adultos sanos. Análisis del efecto de la dosis vacunal sobre la inducción de seroconversión/seroprotección.

**ARTÍCULO SEGUNDO .-** las especificaciones del proyecto de investigación son las siguientes.

Investigador Principal **María Teresa Herrera Mendoza**

Co-investigadores **Jaime Escobar López  
Claudia Robles Roa  
Clara Inés Saavedra**

Asesor Especial: **Antonio Iglesias Gamarra**

**1. INTRODUCCION**

La investigación biomédica debe ser concebida como un proceso encaminado a brindar respuestas precisas a preguntas concretas relacionadas con problemas de salud de la población en la cual la investigación se desarrolla. Un país como el nuestro requiere ante todo un sistema de diagnóstico eficiente de alto nivel tecnológico que permita realizar el oportuno y adecuado manejo de las patologías de más frecuente ocurrencia en nuestro medio. En forma paralela, debe existir un programa de investigación clínica que aborde el estudio de problemas concretos de salud y suministre elementos inmediatos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de nuestras patologías.



034 21 OCT. 1997

En esta línea de pensamiento, la inmunoprevención e inmunodiagnóstico de las enfermedades infecciosas ocupa un lugar relevante de incuestionable transcendencia. El empleo de una vacuna debe ser validado mediante estudios clínicos en los cuales se evalúe su efecto comparando esquemas y dosis alternativas en diferentes grupos de edad, con el fin de definir el protocolo ideal de aplicación de la vacuna para una población determinada. En nuestro país, el empleo de las vacunas utilizadas en las campañas masivas de vacunación se apoya, salvo excepciones aisladas, en trabajos de investigación realizados habitualmente en el país productor de la vacuna. Sin embargo, reviste una indiscutible importancia validar el empleo de una vacuna mediante estudios realizados con la población nativa, que permitan definir la dosis óptima y el esquema adecuado a emplear con el fin de obtener los mejores resultados e inducir mediante la aplicación de la vacuna la tasa más alta de seroconversión y el índice más elevado de seroprotección para lograr, finalmente, la prevención de la enfermedad.

En nuestro país, las vacunas anti-hepatitis B de 2ª generación o recombinantes, han sido aplicadas desde 1986 y utilizadas en programas masivos de vacunación desde 1990. Tres vacunas diferentes han sido comercializadas y empleadas, a saber Heprecomb Berna®, Heberbiovac HB® y Engerix B®.

Los estudios realizados y publicados en nuestro país, se han concentrado en el empleo y evaluación de las vacunas Heberbiovac HB® y Engerix B®, demostrando la capacidad de estas vacunas para inducir seroconversión y provocar seroprotección. Sin embargo, y a pesar de ser empleada en algunos programas de vacunación, no existen estudios, hasta donde es de conocimiento de los autores de este trabajo, que apoyen el empleo de la vacuna Heprecomb Berna®, cuya utilización se basa en trabajos realizados en Suiza y Japón. Carecemos entonces de información sobre la inmunogenicidad de esta vacuna en nuestra población, especialmente en relación con el efecto de la dosis vacunal sobre la respuesta de los individuos vacunados. Siguiendo las recomendaciones del fabricante se ha empleado una dosis para adultos de 10 µg de la vacuna Heprecomb Berna®, esta dosis podría ser o no ser adecuada para nuestra población considerando sus características étnicas, genéticas, demográficas, clínicas y epidemiológicas y la endemidad de la enfermedad en el país y su efectividad debe ser evaluada en la población nativa. Por otra parte el Ministerio de Salud, a través del *Plan Nacional Control de las Hepatitis Virales B y D Colombia 1992-1997*, ha recomendado la aplicación de una dosis para adultos de 20 µg siguiendo un esquema 0,1,6 meses, sin que otras dosis hayan sido evaluadas y, salvo algunas excepciones, sin que otros esquemas hayan sido probados para nuestra población. La aplicación de la vacuna Heprecomb Berna® a la dosis recomendada por el fabricante para niños y adultos, podría representar quizá una excelente alternativa para la población pediátrica y adulta con un adecuado balance costo-beneficio para el paciente.

Este proyecto representa el punto de partida de la investigación en inmunodiagnóstico de las enfermedades infecciosas en el naciente Laboratorio de Inmunología del Servicio de Salud de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. Simultáneamente, el proyecto aborda la inmunoprevención como aspecto fundamental de la hepatitis B, una enfermedad infecciosa que representa un problema de salud pública en Colombia y el mundo.



034 21 OCT. 1997

## 2. JUSTIFICACION

La hepatitis B representa un problema mundial de salud pública. La infección por el virus, comúnmente adquirida por inoculación parenteral o contacto sexual, determina la aparición de un cuadro agudo o crónico de enfermedad hepática y se asocia con el desarrollo de cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular.

La inmunización activa empleando vacunas hemoderivadas o recombinantes, constituye la única medida eficaz de prevención y control de la enfermedad. La hepatitis B puede afectar individuos en todos los grupos etáricos, y algunos grupos caracterizados por conductas o actividades laborales particulares son especialmente susceptibles. La vacunación anti-hepatitis B debe ser realizada, de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de Salud, en los pacientes pediátricos y adultos (pertenecientes a grupos de alto, mediano o bajo riesgo).

Las vacunas anti-hepatitis B han estado disponibles desde 1982, inicialmente como vacunas constituidas por partículas virales (antígeno de superficie) obtenidas del plasma de portadores crónicos (vacunas de 1ª generación o biológicas). A partir de 1986 se impuso el empleo de las vacunas anti-hepatitis B de 2ª generación o biosintéticas, producidas mediante el empleo de la tecnología del DNA recombinante en sistemas biológicos. El uso de estas vacunas está exento de los riesgos inherentes al empleo de las vacunas biológicas preparadas a partir del plasma.

En nuestro país a partir de 1990 ha sido de común empleo la vacuna recombinante anti-hepatitis B HEBERBIOVAC HB producida en el Instituto de Biotecnología e Ingeniería Genética de la Habana, Cuba. La vacuna ha sido empleada en programas masivos de vacunación utilizando los esquemas 0,1,2 meses ó 0,1,6 meses ó 0,1,2+12 meses. Sin embargo, otras dos vacunas recombinantes existen en el mercado, a saber: Heprecomb (Berna) y Engerix B (SmithKlineBeechamBiologcals).

La mayoría de los estudios realizados y publicados en nuestro medio han evaluado y validado el empleo de las vacunas Heberbiovac HB y Engerix B. Estos estudios han demostrado la capacidad de estas vacunas para inducir seroconversión y provocar seroprotección en los individuos vacunados aplicando dosis de 20 µg a los pacientes adultos y de 10 µg a los pacientes pediátricos. Sin embargo, en estos trabajos no se ha realizado un estudio detallado de la cinética de la respuesta inmune y a pesar de que sus resultados permiten establecer la existencia y determinar la prevalencia de respondedores altos y bajos y de no respondedores a la vacuna, en general estos trabajos no se han concentrado en el análisis del fenómeno de la no respuesta a la vacuna. Por otra parte, los estudios actualmente disponibles no han evaluado el estado de inmunización de los individuos vacunados y su comportamiento en el tiempo mucho después de la aplicación del esquema primario de vacunación.

En Colombia, de acuerdo con las recomendaciones de la casa fabricante, la vacuna HEPRECOMB ha sido utilizada empleando un esquema 0,1,6 meses y aplicando una dosis de 10 µg en pacientes adultos o pediátricos. El empleo de



esta vacuna se ha apoyado en trabajos de investigación clínica realizados en Suiza y Japón, en los que se estudia el efecto de la vacuna en una población con características étnicas, genéticas, demográficas y epidemiológicas diferentes de las características de nuestra población. No se cuenta con estudios realizados en nuestro medio en los cuales se evalúe la vacuna utilizando la dosis sugerida por el fabricante y en los que se determine la inmunogenicidad de la vacuna en la población adulta nativa.

Puesto que un individuo se encuentra en riesgo potencial de adquirir la enfermedad antes, durante o después del momento en el cual la vacuna comienza a ser aplicada, resulta de capital importancia definir la cinética de la respuesta inmune después de la primera dosis de la vacuna y establecer cómo ésta respuesta se comporta como resultado de la aplicación de las dosis sucesivas con el fin de determinar cuándo y en qué medida el individuo vacunado experimenta seroconversión y alcanza el estado de seroprotección. Así mismo, resulta importante establecer para nuestra población la existencia de individuos no respondedores, respondedores altos y respondedores bajos.

La evaluación de una vacuna cuyo empleo se propone como medida eficaz para el control de una enfermedad, y el estudio de la cinética de la respuesta inducida por su aplicación y del efecto de la dosis aplicada sobre su inmunogenicidad, brinda elementos inmediatos y objetivos para validar su empleo y permite definir su valor real como herramienta en el control y prevención de la enfermedad.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GENERALES

- 3.1.1. Evaluar la inmunogenicidad de una vacuna anti-hepatitis B recombinante, empleando y comparando dos dosis diferentes de la vacuna, en individuos sin contacto previo con el virus de la hepatitis B.
- 3.1.2. Realizar el análisis de la cinética de la respuesta inmune humoral inducida por la aplicación de una vacuna anti-hepatitis B recombinante.

#### 3.2. ESPECIFICOS

- 3.2.1. Evaluar el efecto de la dosis aplicada sobre la inmunogenicidad (seroconversión y seroprotección) de una vacuna anti-hepatitis B recombinante comparando dos dosis diferentes de la vacuna.
- 3.2.2. Analizar la cinética de la producción de anticuerpos IgG anti-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B inducida por una vacuna anti-hepatitis B recombinante.
- 3.3.3. Establecer el efecto de la dosis de la vacuna sobre la cinética de la producción de anticuerpos IgG anti-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B.



3.3.4. Determinar la existencia y frecuencia de individuos no respondedores a la vacuna anti-hepatitis B.

#### 4. MARCO TEORICO

Las hepatitis de etiología viral son las hepatopatías más frecuentes en el mundo. Las hepatitis virales son causadas por virus hepatotrópicos, aunque enfermedades análogas a la hepatitis pueden ser causadas por virus no hepatotrópicos como el virus de Epstein Barr, el citomegalovirus y el virus coxsackie. Existen seis tipos de hepatitis viral causadas por virus hepatotrópicos las cuales se denominan A, B, C, D, E y G.

La Hepatitis B (HB) es una enfermedad hepática causada por un virus ADN clase I, perteneciente a la familia Hepadnaviridae subfamilia Orthohepadnaviridae (16,18), denominado Virus de la Hepatitis (VHB).

El período de incubación de la hepatitis B es de 45 a 120 días (18) y el cuadro clínico se caracteriza por malestar general, anorexia, náuseas, vómito, diarrea, febrícula, coluria, acolia, ictericia, hepatomegalia y dolor abdominal (21). La enfermedad se caracteriza por elevación en los niveles de aminotransferasas, hiperbilirrubinemia (con predominio de bilirrubina directa) e incremento en la concentración de fosfatasa alcalina. La enzima alanino amino transferasa permanece elevada por más tiempo y su determinación es útil para seguir el curso de la enfermedad (26).

La enfermedad puede presentar un curso agudo o crónico y desde el punto de vista clínico puede adoptar dos formas diferentes: hepatitis anictérica ó hepatitis icterica. La tercera parte de los pacientes con HB aguda presenta una infección subclínica y no desarrolla síntomas de enfermedad. Estos pacientes poseen marcadores serológicos de infección y la enfermedad se detecta por elevación en los niveles de alanino y aspartato aminotransferasa. La tercera parte de los pacientes con HB aguda desarrolla una enfermedad leve sin ictericia, semejante a una gripe. Finalmente solo un tercio de los pacientes con HB aguda desarrolla ictericia acompañada de los síntomas característicos de la enfermedad (21). En resumen dos terceras partes de los cuadros de hepatitis aguda cursa sin ictericia. Cuando aparece como síntoma de la enfermedad, la ictericia habitualmente alcanza su nivel máximo en 1-2 semanas y entonces experimenta remisión gradual.

Existen cuatro formas de transmisión de la enfermedad, a saber: transmisión horizontal, vertical, parental y sexual (2,3,7,13,14,33,37). El vehículo principal para la transmisión del virus es la sangre, pero otros fluidos biológicos potencialmente infecciosos incluyen sudor, lágrimas, saliva, leche materna, orina y semen. El ADN del VHB ha sido encontrado en muestras concentradas de saliva, orina y líquido seminal de pacientes positivos para el antígeno e del VHB (40). La transmisión horizontal se produce entre parientes y contactos familiares y es posible que la saliva y la sangre sirvan como vehículos para transmisión del virus. La transmisión vertical se produce a partir de las madres portadoras del virus y tiene lugar durante el nacimiento como resultado de la mezcla de sangre materna y fetal. La transmisión parenteral se produce a través de sangre y productos hemoderivados por inoculación accidental o intencional. La



transmisión sexual es la forma de transmisión más importante y es particularmente frecuente en las áreas de baja endemicidad en las cuales la transmisión horizontal y perinatal es infrecuente.

La respuesta individual a la infección y el curso clínico de la enfermedad puede adoptar diversas formas. Transcurrido el período de incubación, el paciente puede desarrollar un cuadro de infección clínica (ictérica o anictérica) o de infección subclínica. La infección clínica o subclínica puede evolucionar hacia la recuperación y el desarrollo de inmunidad o hacia el estado de portador crónico. Los pacientes con infección clínica pueden desarrollar un cuadro de hepatitis fulminante, casi siempre fatal (40).

El paciente en estado de portador crónico puede convertirse en un portador sano o desarrollar un cuadro de hepatitis crónica persistente o activa. La hepatitis crónica persistente puede experimentar reactivación y dar lugar a hepatitis crónica activa o evolucionar hacia el desarrollo de cirrosis hepática que a su vez puede degenerar en carcinoma hepatocelular primario. Por su parte la hepatitis crónica activa puede también dar lugar al carcinoma hepatocelular primario. Finalmente, la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular primario pueden conducir a la muerte del paciente (40).

En resumen, el paciente infectado con el VHB puede experimentar recuperación o desarrollar hepatitis fulminante, hepatitis crónica, cirrosis hepática o carcinoma hepatocelular. La recuperación total de la enfermedad puede tomar 6 meses o más y se caracteriza por cansancio persistente e intolerancia al alcohol.

La hepatitis fulminante se caracteriza por necrosis hepática masiva e insuficiencia hepática aguda. La enfermedad se caracteriza por prolongación del tiempo de protrombina y de tromboplastina parcial y elevación de la concentración de transaminasas ( $\geq 200$  UI/L) y de bilirrubina (5-20 mg/dl) con predominio de bilirrubina directa. La evolución clínica de la enfermedad se caracteriza por encefalopatía progresiva, hemorragia generalizada y coagulopatía (26).

Los pacientes que no experimentan recuperación total después de un episodio de hepatitis aguda se convierten en portadores crónicos, estado caracterizado por persistencia del antígeno de superficie del VHB en sangre por más de 6 meses. El cuadro de infección crónica se presenta con mayor frecuencia cuando la infección es asintomática o cuando ocurre a edad temprana y es más común en pacientes de sexo masculino (16,40). Entre los pacientes adultos infectados por el VHB, el 90% experimenta recuperación y el 10% desarrolla el estado de portador crónico, mientras que el 1% desarrolla un cuadro de hepatitis fulminante (21). Entre los neonatos el desarrollo del estado de portador crónico es más frecuente y se produce en el 90% de los pacientes infectados. Durante la infección crónica la cocirculación de antígenos virales y anticuerpos anti-antígenos virales lleva al depósito de inmunocomplejos y puede dar lugar a una enfermedad por inmunocomplejos (16). La aparición de enfermedad por inmunocomplejos depende de la proporción relativa de antígenos y anticuerpos circulantes.



La hepatitis crónica se clasifica como hepatitis crónica persistente o hepatitis crónica activa. La hepatitis crónica persistente es una enfermedad hepática leve no progresiva caracterizada por alteraciones inflamatorias limitadas a la tríada portal sin necrosis o fibrosis hepática. La enfermedad suele ser asintomática o presentar un cuadro caracterizado por malestar general, fatigabilidad y pérdida de peso, anorexia y dolor a nivel del hipocondrio derecho. La enfermedad se caracteriza por elevación en la concentración de aminotransferasas (50 - 200 UI/L) y bilirrubina normal o ligeramente elevada (rara vez por encima de 3 mg/dl) con concentración de albúmina y tiempo de protrombina normales (26).

La evolución de la hepatitis crónica persistente a hepatitis crónica activa o cirrosis hepática es rara, aproximadamente el 5 % de los pacientes con hepatitis crónica persistente desarrolla hepatitis crónica activa, aunque la enfermedad no suele experimentar reparación espontánea (26).

La hepatitis crónica activa presenta un curso progresivo hacia la cirrosis hepática y la insuficiencia hepática aguda. La enfermedad se caracteriza por necrosis irregular del lobulillo hepático (necrosis paracelular periférica). El cuadro clínico de la enfermedad está constituido por fiebre, malestar intenso, ictericia, dolor en hipocondrio derecho, edema, ascitis, artralgia, artritis, erupción cutánea y pleuritis. La enfermedad cursa con elevación de la concentración de transaminasas (>1000 UI/L), hipoalbuminemia, hipoprotrombinemia e hipergammaglobulinemia. El 20 - 30 % de los pacientes presentan antígeno de superficie de VHB (26).

En unión con factores aún desconocidos el VHB provoca carcinoma hepatocelular primario (6). El desarrollo de carcinoma hepatocelular es particularmente frecuente después de la infección crónica que comienza en la lactancia o la primera infancia. Los pacientes con infección crónica por el VHB tienen un riesgo 200 veces mayor de desarrollar carcinoma hepatocelular primario comparados con los individuos sanos. El genoma completo del VHB puede ser integrado en el genoma de la célula huésped y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B es detectado en el citoplasma de las células que contienen el ADN viral integrado (31). El ADN integrado del VHB ha sido encontrado en las células de carcinoma hepatocelular primario en el hombre, aunque el papel exacto del virus en el desarrollo de la enfermedad no es conocido. Es posible que la integración del genoma viral altere la transcripción de un gen celular regulador de la división celular o que el producto del gen viral X, denominado antígeno X, induzca la transcripción de otros genes (16).

El inmunodiagnóstico de la hepatitis B se realiza con base en la detección de marcadores serológicos de la enfermedad, que indican la existencia de infección y suministran información acerca de su progreso. Los marcadores serológicos de infección por el VHB son los antígenos del virus y los anticuerpos producidos por el organismo en respuesta a estos antígenos virales. Así mismo, se emplea la detección del ADN viral como marcador de la infección por el VHB e indicador de la evolución de la enfermedad. La detección de antígenos virales y anticuerpos, en suero o plasma, se realiza empleando técnicas de radioinmunoensayo o inmunoensayo enzimático. La detección del ADN del VHB, en suero



034 21 OCT. 1997

o plasma, se realiza empleando la técnica de *Southern blot*. Han sido descritos tres sistemas de antígeno/anticuerpo para el VHB (40):

- a) **Antígeno de superficie del VHB (HBsAg):** Es el primer marcador que se detecta en el suero. Indica infección activa aguda o crónica. Cuando esta presente junto con anti-HBc IgM indica infección aguda y cuando esta presente junto con anti-HBc IgG indica infección crónica. Si persiste positivo por más de 6 meses indica infección crónica. Su desaparición indica que la infección ha sido superada.
- b) **Antígeno central del VHB (HBcAg):** No se detecta libre en sangre, suero o plasma (38,40).
- c) **Antígeno e del VHB (HBeAg):** Indica infección con alta tasa de replicación viral y alta infectividad. Puede detectarse tanto en la infección aguda como en infección crónica. Su presencia indica infección aguda y su persistencia por más de 6 meses indica infección crónica.
- d) **Anticuerpos anti-antígeno de superficie del VHB (anti-HBs):** Es el último marcador que aparece en el suero. Indica inmunidad para la HB por resolución de la enfermedad (o por vacunación).
- e) **Anticuerpos anti-antígeno central (anti-HBc):**

**Anti-HBc IgM:** Es la primera clase de anticuerpos detectados en el paciente infectado. Su presencia indica infección actual o reciente. Indican infección aguda cuando su título es alto o infección crónica cuando su título es bajo. Cuando aparece junto con HBsAg indica infección aguda. Puede permanecer positivo hasta por 6 meses.

**Anti-HBcAg IgG:** Su presencia indica infección antigua o crónica. Indica infección antigua cuando aparece con HBsAg negativo ó infección crónica cuando aparece con el HBsAg positivo. Indica infección resuelta cuando aparece con anti-HBs positivos. Permanece positivo durante varios años. Puede ser el único marcador detectable en el periodo de ventana (después de la desaparición del HBsAg y antes de la aparición de anti-HBs). Cuando aparece aislado, el paciente se encuentra en el periodo de ventana inmunológica y requiere ser evaluado nuevamente 6 meses después.

- f) **Anticuerpos anti-antígeno e (anti-HBe):** Aparece cuando el HBeAg ya no es detectable. Indica convalecencia o infección crónica. La presencia de anti-HBe en ausencia de HBsAg o anti-HBs indica que el paciente se encuentra en la fase de convalecencia de la enfermedad.
- g) **ADN del VHB:** Es el indicador más sensible de replicación viral. Indica la existencia de infección activa. Permite cuantificar la carga viral y determinar el momento de iniciar la terapia anti-viral. Se emplea en el monitoreo de la terapia anti-viral y es útil en el seguimiento y pronóstico de la infección por VHB.

El estudio de pacientes con infección aguda e infección crónica por el VHB ha permitido definir el comportamiento de los marcadores serológicos de infección

por el VHB. Estos marcadores serológicos aparecen en un orden secuencial definido: HBsAg, HBeAg, anti-HBc, anti-HBe y anti-HBs. Frecuentemente el HBsAg y el HBeAg aparecen simultáneamente, generalmente HBsAg aparece 6 semanas después de la infección y desaparece 6 meses después, en todos los casos la aparición de anti-HBe coincide con la desaparición del HBsAg mientras que la aparición de anti-HBs se produce 1 a 6 meses después de la desaparición de HBsAg (32).

Diferentes perfiles serológicos han sido definidos para la infección aguda por VHB: a- Perfil caracterizado por la desaparición de HBeAg seguida por la aparición inmediata de anti-HBe. La seroconversión de HBeAg a anti-HBe usualmente ocurre 2 a 4 semanas antes de la desaparición del HBsAg; b- Perfil caracterizado por la desaparición de HBeAg seguida de un lapso de 1 a 4 semanas antes de la aparición de anti-HBe. En muchos casos el único marcador serológico de infección por el VHB durante este periodo es anti-HBc. El marcador anti-HBe aparece dentro de las dos semanas que siguen a la desaparición de HBsAg; c- Perfil caracterizado por la desaparición de anti-HBe 2-3 meses después de su aparición con persistencia de anti-HBc y anti-HBs y d- Perfil caracterizado por la desaparición de anti-HBe y anti-HBs 6 meses después de su aparición con persistencia de anti-HBc. En este caso anti-HBc es el único marcador serológico de infección presente en el suero (32). Los perfiles mencionados aparecen en el 73%, 18%, 3% y 2%, respectivamente, de los pacientes estudiados.

Tres perfiles serológicos típicos han sido descritos para la infección crónica por el VHB: a- Perfil caracterizado por la presencia persistente de HBsAg y HBeAg, b- Perfil caracterizado por la presencia persistente de HBsAg y anti-HBe (asociado con el estado de portador crónico asintomático) y c- Perfil caracterizado por la presencia de HBeAg por un periodo prolongado seguido de seroconversión a anti-HBe con persistencia de HBsAg (32). En todos los casos estudiados los pacientes presentan antigenemia HBsAg persistente. El perfil más frecuentemente observado es aquel caracterizado por la persistencia de HBsAg y HBeAg.

El VHB es el miembro principal de la familia Hepadnaviridae conformada por los agentes causantes de hepatitis en el hombre, la marmota, la ardilla y el pato (31). La infección por hepadnavirus se asocia con hepatitis aguda y crónica, enfermedad mediada por inmunocomplejos y carcinoma hepatocelular (38). Los virus de la familia hepadnaviridae se caracterizan por tener un rango de huéspedes y un tropismo tisular muy limitado. En la naturaleza el VHB infecta solamente al hombre, aunque experimentalmente se ha producido la infección en chimpancés (38). El VHB infecta el hígado y posiblemente el páncreas del hombre y en infecciones experimentales el hígado y el páncreas del chimpancés (31).

El VHB infecta 200 millones de personas en todo el mundo provocando enfermedad hepática aguda, enfermedad hepática crónica y carcinoma hepatocelular (16). Se ha calculado que existen 300 millones de portadores del VHB en el mundo. En Colombia la prevalencia del antígeno de superficie del VHB es 4.7% y oscila entre 2.8% para la región oriental y 7.1% para la región central



del país (23). El virus infecta a personas de todos los grupos étnicos pero las personas de origen chino son particularmente susceptibles (16).

Los viriones del virus de la hepatitis B son partículas esféricas de 42-47 nm de diámetro que muestran una porción central esférica electrodensa de 22-25 nm de diámetro y una envoltura externa de 7 nm de espesor (38). La porción esférica interna contiene el antígeno central (HBcAg), el antígeno e (HBeAg), el ADN viral, la polimerasa de ADN y una proteína kinasa que fosforila polipéptidos estructurales de la partícula central del virus. La envoltura viral que contiene lípidos, porta el antígeno de superficie (HBsAg) con el cual reaccionan los anticuerpos neutralizantes del virus de la hepatitis B (38).

La concentración de viriones en el suero de pacientes infectados por el virus de la hepatitis B puede ser superior al  $10^9$ /ml. Además de los viriones, existen formas particuladas esféricas y tubulares más numerosas ( $10^{13}$ /ml), en el suero de los pacientes infectados por el virus de la hepatitis B. Estas partículas portan el HBsAg del virus de la hepatitis B (38). Las partículas contienen lípidos, proteínas y carbohidratos pero no contienen componentes de la porción central del virión y se consideran formas incompletas de la envoltura del virus (38). El contenido (aproximadamente 30%) y la composición (fosfolípidos libres y esterificados con colesterol y triglicéridos) de los lípidos de las partículas esféricas de HBsAg indican que estas partículas se originan a partir de la membrana celular (36,38).

El ADN de los hepadnavirus esta constituido de una cadena sencilla larga o banda (-) de longitud constante (3000-3300 bases) y una cadena sencilla corta o banda (+) de longitud variable (1.700-2.800 bases). La secuencia de la banda (-) de ADN viral es complementaria de la secuencia del ARNm viral. Una enzima con actividad de ADN polimerasa en el virión repara la región monocatenaria en el ADN viral para formar moléculas complemente bicatenarias (38). En este proceso, la síntesis de ADN es iniciada en el extremo 3' de la banda (+) y es concluida en el extremo 5' de esta molécula. Existe un polipéptido unido covalentemente al extremo 5' de la banda (-) de ADN viral el cual actúa como un iniciador para la síntesis de esta banda. Un oligorribonucleótido de 19 nucleótidos se encuentra unido en forma covalente al extremo 5' de la banda (+) de ADN viral y funciona como un iniciador para la síntesis de esta banda (16,38).

El genoma del VHB es una pequeña molécula de ADN circular parcialmente monocatenario y parcialmente bicatenario (38) que codifica para una enzima con actividad de transcriptasa reversa y experimenta replicación a través de un ARN intermediario (31). El genoma del virus está constituido por una molécula de ADN conformada por una banda lineal (-) ligada en forma covalente a una proteína en su extremo 5' y una banda lineal (+) complementaria que representa una copia incompleta de la molécula (16). La banda (+) de ADN se sobrepone a la unión 5'-3' de la banda (-) y convierte la molécula de ADN lineal en una molécula circular.

El genoma del virus de la hepatitis B esta constituido por cuatro genes (marcos de lectura abierta), localizados en la banda (-) de ADN, denominados genes C, S, P y X (38). Estos genes parcialmente sobrepuestos son transcritos en diferentes marcos de lectura y ninguno de ellos se encuentra interrumpido por secuencias interpuestas.



**a- Gen C y Antígeno c**

El gen C codifica la estructura del polipéptido correspondiente al HBcAg y del polipéptido correspondiente al HBeAg (38). El HBcAg y el HBeAg son especificidad antigénicas diferentes de la proteína codificada por el gen C. El HBcAg es un polipéptido único de 22.000 daltons (p22<sup>c</sup>) con una longitud de 183 - 185 aminoácidos. Los 34 aminoácidos carboxiterminales de p22<sup>c</sup> son ricos en arginina y se unen al DNA viral. El HBeAg es un polipéptido de 16.000 daltons (p16<sup>e</sup>) que corresponde a la forma truncada de p22<sup>c</sup> carente de los 34 aminoácidos carboxiterminales o dominio básico de unión al DNA (38).

Una actividad de proteína kinasa encontrada en la porción central del virión fosforila el polipéptido p22<sup>c</sup> en residuos de serina y treonina, y el polipéptido fosforilado es clivado para producir una proteína de 16.000 daltons (38). La existencia de una secuencia de aminoácidos correspondiente a un sitio activo de proteasas, en el extremo aminoterminal de p22<sup>c</sup>, sugiere que p22<sup>c</sup> podría tener actividad de proteasa y experimentar autoclivaje para formar la proteína p16<sup>e</sup>.

El HBcAg es un inmunógeno potente y una respuesta de anticuerpos y de células T es detectada en casi todos los pacientes infectados por el VHB. La inmunización de animales experimentales con el antígeno central purificado protege a los animales contra la infección por el VHB, lo cual indica que este antígeno induce una respuesta inmune protectora. En animales experimentales el HBcAg ha demostrado ser mucho más inmunógeno que el HBsAg (38).

**b- Gen S y Antígeno S**

El gen S codifica la estructura de los polipéptidos del HBsAg de la envoltura de virión y de las partículas del HBsAg encontradas en la sangre y el hígado de los individuos infectados (38).

El gen S está constituido por 3 regiones denominadas pre-S1, pre-S2 y S. Los polipéptidos codificados por el gen S consisten de formas glicosiladas y no glicosiladas de tres polipéptidos codificados respectivamente por las regiones S, pre-S2/S y pre-S1/pre-S2/S del gen S (38).

El antígeno de superficie esta constituido por polipéptidos (31,38).

• **Polipéptidos codificados por la región S**

p24<sup>s</sup> (PM 24.000) y gp27<sup>s</sup> (PM 27.000)

Son los polipéptidos predominantes en las preparaciones del antígeno de superficie y poseen la capacidad de ensamblarse en partículas esféricas de 20 nm que son liberadas a partir de las células infectadas sin requerir de secuencias pre-S (38).

• **Polipéptidos codificados por la región pre-S2/S**



UNIVERSIDAD  
COLEGIO MAYOR  
DE CUNDINAMARCA

p33<sup>s</sup> (PM 33.000) ygp36<sup>s</sup> (PM 36.000)

• Polipéptidos codificados por la región pre-S1/pre-S2/S

p39<sup>s</sup> (PM 39.000) ygp42<sup>s</sup> (PM 42.000)

La secuencia codificada por pre-S1 corresponde a los residuos de aminoácidos 1-119, la secuencia codificada por pre-S2 corresponde a los residuos de aminoácidos 120-174 y la secuencia codificada por S corresponde a los residuos de aminoácidos 175-400 del HBsAg (38).

Las partículas esféricas de 20 nm del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B contienen casi exclusivamente los polipéptidos pequeños p24<sup>s</sup> y p27<sup>s</sup> codificados por la región S. Las formas filamentosas contienen principalmente los polipéptidos p24<sup>s</sup> y gp27<sup>s</sup> y pequeñas cantidades de los polipéptidos p33<sup>s</sup> y gp36<sup>s</sup> codificados por las regiones pre-S2/S y los viriones contienen todos los polipéptidos del antígeno de superficie en cantidades equimolares (38).

Después de la infección primaria por el VHB los pacientes desarrollan una respuesta inmune anti-pre-S1, anti-pre-S2 y anti-S. In vivo la respuesta anti-pre-S1 antecede a la respuesta anti-S (34). Los pacientes con hepatitis B aguda desarrollan anticuerpos que reaccionan con péptidos sintéticos correspondientes a las regiones pre-S1, pre-S2 y S (30), y se ha demostrado la respuesta proliferativa de linfocitos T a péptidos sintéticos correspondientes a la región S en todos los casos de hepatitis B aguda (30). En la etapa tardía de la enfermedad esta respuesta blastogénica disminuye para reaparecer durante la etapa de convalecencia.

Las partículas del HBsAg son antigénicamente complejas y al menos cinco especificidades antigénicas son encontradas en estas partículas: un determinante específico de grupo (a) presente en todas las preparaciones del antígeno de superficie y cuatro determinantes de subtipo (d/y y w/r) que son mutuamente excluyentes y se comportan como alelos. La combinación de estos determinantes antigénicos da lugar a los subtipos del HBsAg. Existen siete subtipos del HBsAg denominados ayw, ayw2, ayw3, ayr, adw2, adw4 y adr (38). No existen diferencias biológicas entre virus de diferentes subtipos antigénicos, sin embargo los subtipos del antígeno de superficie están distribuidos en forma irregular alrededor del mundo y constituyen así marcadores epidemiológicos útiles de la propagación del virus en las poblaciones humanas.

Los polipéptidos codificados por la región S (p24<sup>s</sup> y gp27<sup>s</sup>) contienen los determinantes específicos de grupo (a) y los determinantes específicos de subtipo (d/y - w/r) del antígeno de superficie (31,38). Los antígenos de grupo (a) y de subtipo (d/y) han sido localizados en un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 284-311 (ó 296-311) codificados por la región S (38).

Las secuencias pre-S2 contienen un antígeno capaz de inducir inmunidad protectora. La inmunización de animales experimentales con un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 120-153 de la región pre-S2 protege a estos animales de la infección por el virus de la hepatitis B y la mezcla del virus con anticuerpos producidos contra este péptido previene la infección por ino-



culación subsecuente. Este péptido posee un antígeno que puede provocar una respuesta inmune protectora e inducir la producción de anticuerpos neutralizante anti-VHB (38). Los péptidos sintéticos con secuencias pre-S2 contienen epitopes específicos de grupo (a.a. 133-139) y específicos de tipo (a.a. 137-143) (38).

El polipéptido codificado por pre-S1 ha sido implicado en la unión del antígeno de superficie del virus a los hepatocitos. Este polipéptido también ejerce un efecto sobre la secreción de las proteínas de la envoltura viral y parece afectar el ensamblaje del virus (38).

c- Gen P

El gen P codifica para un polipéptido de 90.000 daltons que se une al extremo 5' de la banda (-) de ADN y actúa como iniciador proteico para la síntesis de esta banda (38).

d- Gen X

El gen x codifica para un polipéptido de 154 aminoácidos denominado proteína X (antígeno X) (38). La proteína X se encuentra involucrada en la regulación positiva o activación de la transcripción de genes heterólogos virales y celulares (38).

Después de la penetración del virus en la célula, la nucleocápside y el genoma del virus son liberados en el núcleo celular. La cadena sencilla corta del genoma es completada para formar un ADN bicatenario completo que es transcrito en moléculas individuales de ARNm por polimerasas de ARN de la célula huésped (31).

Una molécula de ARNm de 3.200 pares de bases es sintetizada como un template para la replicación del genoma viral. El virus de la hepatitis B utiliza una enzima transcriptasa reversa para sintetizar un ADN complementario (ADNc) a partir de esta molécula de ARN (31). El ADNc así sintetizado es la banda (-) del genoma del virión. El template de ARN y la polimerasa son encapsulados dentro de la nucleocápside y la síntesis de la banda (-) del ADN viral se produce a partir de un iniciador proteico codificado por el genoma viral también incluido en el centro del virus. El ARN es degradado a medida que el ADN es sintetizado. La banda (+) de ADN es sintetizada a partir de la banda (-) de ADN (31). La cápside es envuelta dentro de las membranas que contienen el HBsAg tan pronto como es formada, capturando genomas que contienen círculos de ARN-ADN con ARN de diferentes longitudes. La degradación continua del ARN remanente en el virión produce un genoma de ADN parcialmente bicatenario (31).

La HB es una enfermedad para la cual no existe tratamiento, salvo por el empleo de reciente del interferón alfa para el manejo de los pacientes con hepatitis B crónica (15). Sin embargo la enfermedad puede ser prevenida a través de la inmunización activa o pasiva. La inmunización con partículas altamente purifi-

UNIVERSIDAD  
COLEGIO MAYOR  
DE CUNDINAMARCA

La administración de preparaciones de inmunoglobulina con un alto título de anticuerpos contra el HBsAg determina la protección contra la infección por el VHB, lo cual indica que la respuesta inmune contra este antígeno confiere inmunidad (38).

Existen dos tipos de vacunas anti-hepatitis B

- a) Vacunas de 1ª generación : Vacunas anti-hepatitis B derivadas del plasma de pacientes portadores crónicos de HBsAg (Heptavax).
- b) Vacunas de 2ª generación : Vacunas recombinantes obtenidas a partir de cultivos de células eucarióticas mediante el empleo de la tecnología del ADN (Recombivax, Engerix B, Heberbiovac y Hepmb).

Las vacunas anti-hepatitis B derivadas del plasma y las vacunas anti-hepatitis B recombinantes están constituidas por partículas del HBsAg y contienen solo determinantes antigénicos codificados por la región S, pero no determinantes codificados por las regiones pre-S1 y pre-S2 del gen S (38). La capacidad de estas vacunas para proteger contra la infección por el VHB indica que la respuesta inmune para los determinantes S, confiere protección contra la infección. Por otra parte, la protección contra la reinfección por el VHB del mismo subtipo o de subtipos diferentes sugiere que la respuesta inmune dirigida contra el determinante S es suficiente para proteger al individuo. La respuesta inmune dirigida contra los determinantes específicos de subtipo confiere protección contra virus del mismo subtipo pero no contra virus de subtipos diferentes (34).

Las vacunas derivadas del plasma han sido evaluadas, empleando dosis de 10 y 20  $\mu\text{g}$  con esquemas de aplicación 0,1,2 y 0,1,6 meses, en estudios clínicos en los cuales se ha demostrado su capacidad para provocar seroconversión e inducir niveles protectores de anticuerpos en los individuos vacunados (19,29,34).

En los últimos años las vacunas recombinantes han sido utilizadas con éxito en la prevención de la hepatitis B y han reemplazado, en muchos países, a las vacunas hemoderivadas.

Las vacunas recombinantes son producidas en sistemas biológicos, habitualmente cultivos de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mediante inserción en el vector de expresión de la secuencia que codifica para el HBsAg (28,44). El gen del HBsAg corresponde a una secuencia de 892 pares bases que codifica para un polipéptido de 226 aminoácidos con un PM de 25.398 daltons (43). El HBsAg recombinante producido en estos sistemas biológicos está compuesto de partículas esféricas de 22 nm de diámetro constituidas por un polipéptido de 24.000 daltons, correspondiente a la forma no glicosilada del polipéptido codificado por la región S del gen S (36, 39).

Las vacunas anti-hepatitis B recombinante han sido evaluadas en diferentes estudios (5,12,20,22,24,35,41) y comparadas con las vacunas anti-hepatitis B derivadas del plasma (8,39). Las vacunas recombinantes han demostrado su capacidad para provocar seroconversión e inducir seroprotección cuando son



utilizadas en dosis de 10 µg o 20 µg con esquemas 0,1,2 ó 0,1,6 meses. La comparación con las vacunas derivadas del plasma demuestra que las vacunas recombinantes poseen la misma inmunogenicidad de las vacunas hemoderivadas (8,39). Un estudio ha demostrado, que en los pacientes que reciben la vacuna recombinante, la respuesta inmune se desarrolla más lentamente durante la fase inicial y la tasa de seroconversión y los niveles de anticuerpos anti-HBs son ligeramente más bajos (22). Sin embargo, en este estudio se emplearon dosis de 10 µg de la vacuna recombinante y de 20 µg de la vacuna hemoderivada y es posible que el resultado obtenido sea producido por el empleo de una dosis menor de la vacuna recombinante.

Tanto para las vacunas hemoderivadas como para las vacunas recombinantes se ha descrito la existencia de individuos no respondedores, los cuales no experimentan seroconversión es respuesta a la aplicación de la vacuna, y de individuos hiporespondedores, con una respuesta de anticuerpos anti-HBs ≤ 10 UI/L. El estudio de los individuos que no responden o presentan una respuesta deficiente demuestra que la respuesta a la vacuna anti-HB se encuentra ligada a los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y que se asocia con los haplotipos extendidos HLA-B8,SC01,DR3 (1,25) y HLA-Bw54-DR4-DRw53-DQw4 (45,46).

Se ha sugerido que la respuesta al HBsAg depende de la presencia de un gen de respuesta inmune en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) y que la respuesta deficiente a la vacuna es el resultado de la carencia de este gen y de la presencia del haplotipo HLA-B8,SC01,DR3. La comparación de individuos homocigotos y heterocigotos para este haplotipo ha demostrado que los individuos homocigotos producen niveles significativamente más bajos de anticuerpos anti-HBsAg en respuesta a la vacuna anti-HB (1). El estudio de grupos familiares demuestra que los individuos homocigotos para el haplotipo HLA-B8,SC01,DR3 son no respondedores o respondedores bajos y que los individuos heterocigotos para el haplotipo siempre desarrollan niveles más altos de anticuerpos cuando se comparan con los individuos homocigotos (25).

Los estudios in vitro demuestran que las células mononucleares de sangre periférica de los individuos no respondedores, en contraste con las células mononucleares de individuos respondedores, no producen anticuerpos anti-HBsAg cuando la respuesta al antígeno se evalúa 2 y 4 semanas después de la última dosis de la vacuna (esquema 0,1,6 + 18). Ha sido propuesto que la no respuesta temprana (incapacidad para sintetizar anticuerpos anti-HBsAg en respuesta a la estimulación in vitro con PWM y HBsAg en la 2ª semana) es debida a un defecto en el repertorio de células B, mientras que la no respuesta tardía (incapacidad para sintetizar anticuerpos anti-HBsAg en respuesta a la estimulación in vitro con PWM y HBsAg en la 4ª semana) es provocada por la existencia de células T supresoras específicas del HBsAg (10).

La cinética de la respuesta de anticuerpos IgG anti-HBs ha sido estudiada, in vitro, en pacientes vacunados con la vacuna anti-hepatitis B derivada del plasma empleando un esquema 0,1,6 meses (17). La presencia de anticuerpos anti-antígeno de superficie no es detectada después de la primera dosis de la vacuna (días 0-28), pero la respuesta es detectada pocos días después de la aplicación de la segunda dosis (días 32 y 36). El nivel de anticuerpos se man-



tiene por 6 meses (día 180) y experimenta un incremento en respuesta a la aplicación de la tercera dosis de la vacuna.

Por otra parte, la respuesta blastogénica de linfocitos T estimulados con HBsAg es detectada 28 días después de la aplicación de la primera dosis de la vacuna, momento en el cual no se detecta la presencia de anticuerpos en el suero (17). La respuesta al antígeno de superficie es suprimida 4 días después de la aplicación de la segunda dosis y experimenta una lenta recuperación con una respuesta secundaria detectada en el día 36 y una respuesta aún más intensa en el día 56.

Las células mononucleares de sangre periférica aisladas de individuos a quienes se ha aplicado la vacuna anti-HB (derivada del plasma) proliferan, *in vitro*, después de 5-7 días de incubación con el HBsAg y desarrollan células formadoras de placas secretoras de anticuerpos anti-HBs después de 7-10 días de estimulación con el HBsAg. Este resultado demuestra que células T y B específicas del HBsAg están presentes en la circulación de los individuos vacunados con la vacuna anti-HB (9).

Después de inmunización con la vacuna anti-HB es posible inducir la producción de anticuerpos IgG anti-HBsAg por estimulación *in vitro* con pequeñas concentraciones del HBsAg. Las células mononucleares de sangre periférica de individuos que han recibido la vacuna anti-HB producen espontáneamente anticuerpos IgG anti-HBsAg 2 semanas después de la última dosis de la vacuna (esquema de 0,1,6 meses). La producción de anticuerpos IgG anti-HBsAg puede ser inducida, por pequeñas dosis del HBsAg, 4 semanas después de la última dosis de la vacuna, a pesar de que la secreción espontánea de anticuerpos específicos es este momento es baja. Sin embargo, y aunque la producción espontánea o inducida de anticuerpos anti-HBsAg es dependiente de linfocitos T, no es posible inducir una respuesta proliferativa de linfocitos T por estimulación con el HBsAg durante este periodo en los individuos vacunados (11).

Se ha demostrado una relación entre la respuesta inmune a la vacuna anti-hepatitis B recombinante y el fenotipo de la proteína haptoglobina expresado por los individuos vacunados. La magnitud y la cinética de la respuesta a la vacuna anti-hepatitis B se encuentra influenciada por el fenotipo del individuo vacunado (27). La respuesta a la vacuna de los individuos que portan el fenotipo Hp 2-2 es significativamente más baja que la respuesta de los pacientes que portan otros fenotipos. Los pacientes que expresan el fenotipo Hp 2-2 desarrollan títulos medios más bajos que los pacientes que expresan los fenotipos Hp 1-1 y 2-1, un mes después de la tercera dosis, inmediatamente antes de la cuarta dosis y un mes después de la cuarta dosis, cuando la vacuna se aplica utilizando un esquema 0,1,2+12 meses. Así mismo, la frecuencia del gen Hp 2 es mayor en los pacientes respondedores lentos ó no respondedores.

## 5. METODOS Y MATERIALES

### 5.1. METODOS

El trabajo ha sido diseñado como un estudio clínico descriptivo, comparativo y prospectivo de dos grupos de individuos adultos sanos con características fisi-



cas (sexo, edad, talla y peso) semejantes, cuya respuesta a la aplicación de la vacuna será evaluada en forma independiente y comparada entre

En desarrollo del trabajo propuesto se estudiarán las siguientes tablas:

**a- Variables dependientes :**

- Inmunogenicidad (seroconversión y seroprotección).
- Cinética de producción de anticuerpos IgG anti-antígeno de superficie del VHB

Seroconversión será definida como la aparición, inducida por la aplicación de la vacuna, de anticuerpos IgG anti-antígeno de superficie [concentración > 1 UI/L] en individuos seronegativos (12).

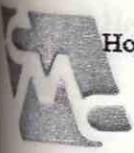
Seroprotección será definida como la producción, inducida por la vacuna, de anticuerpos IgG anti-antígeno de superficie con una concentración  $\geq 10$  UI/L (4).

UI/L = mUI/ml

Las categorías descritas en Tabla 1, definidas con base en la concentración de anticuerpos anti-HBs y adoptadas por el Ministerio de Salud y la Secretaría Distrital de Salud de Santa Fé de Bogotá (Programa Ampliado de Inmunizaciones), serán utilizadas para evaluar la respuesta a la vacuna. En forma adicional se considerarán las categorías respondedor bajo (10-100 UI/L) y respondedor alto (> 100UI/L).

Tabla 1

Categoría	Concentración de anti-HBs
No respondedor	0 UI/L
Hiporrespondedor	< 10 UI/L
Hiperrespondedor	$\geq 100$ UI/L



**b- Variable Independiente:**

- $\beta$
- Dosis aplicada de la vacuna.

**5.1.1. Grupos de Estudio**

Se estudiarán 100 individuos adultos sanos (edad > 16 años) sin evidencia clínica o bioquímica de enfermedad hepática y sin evidencia serológica de contacto previo con el VHB. Los individuos serán incluidos en el estudio después de realizar una evaluación previa consistente en : a- Detección de HBsAg, anticuerpos anti-HBc y anticuerpos anti-HBs y b- Cuantificación de alanino-amino transferasa y aspartato-aminotransferasa.

Solo serán incluidos en el estudio los individuos con resultados negativos en las pruebas de detección de marcadores de serológicos del VHB (HBsAg, anticuerpos anti-HBc y anticuerpos anti-HBs) y con valores normales de aminotransferasas. Los individuos incluidos en el estudio, después de satisfacer el criterio de selección aplicado, serán divididos al azar en dos grupos de 50 individuos cada uno, los cuales serán homogenizados por sexo y en orden ascendente de edad:

**Grupo 1:** Los individuos pertenecientes a este grupo serán vacunados con la vacuna recombinante anti-hepatitis B utilizando el esquema 0,1,6 meses y una dosis de 10 $\mu$ g.

**Grupo 2:** Los individuos pertenecientes a este grupo serán vacunados con la vacuna recombinante anti-hepatitis B utilizando el esquema 0,1,6 meses y una dosis de 20 $\mu$ g.

Se realizará el seguimiento de cada uno de los grupos estudiados de la siguiente manera:

a- Para todos los individuos en cada grupo se determinarán los efectos secundarios de la vacuna dentro de las 72 horas que siguen a la aplicación de cada dosis, empleando un formato diseñado para esta finalidad.

b- Después de realizar la vacunación se obtendrán muestras de sangre venosa con el fin de realizar la detección y cuantificación de anticuerpos IgG anti-antígeno de superficie del VHB, de acuerdo con el siguiente plan de trabajo:

- Se obtendrán 5 muestras de cada paciente (250 muestras para cada grupo y 500 muestras en total).
- La obtención de las muestras se distribuirá a lo largo de un periodo de 18 meses.



UNIVERSIDAD  
COLEGIO MAYOR  
DE CUNDINAMARCA

- Se obtendrá 1 muestra antes de aplicar cada dosis, 1 muestra 1 mes después de aplicar cada dosis y 1 muestra 1 año después de aplicar la 3ª dosis de la vacuna. Siguiendo este protocolo para la obtención de muestras, y con base en el esquema de vacunación (0,1,6 meses), las muestras se obtendrán en los meses 0, 1, 2, 6, 7 y 18.

### 5.1.2. Vacuna

Cada uno de los individuos en cada grupo será vacunado con la vacuna recombinante anti-hepatitis B HEPRECOMB Berna®. Se empleará un esquema de vacunación 0,1,6 meses con intervalos de 1 mes (1ª - 2ª) y 5 meses (2ª - 3ª) entre dosis. Se aplicarán 3 dosis de 10 µg (0.5 ml) a los individuos incluidos en el grupo 1 y 3 dosis de 20 µg (1.0 ml) a los individuos incluidos en el grupo 2. Cada dosis de la vacuna se aplicará por vía intramuscular en la región deltoidea.

### 5.1.3. Detección de marcadores serológicos de infección por el VHB

A todos los individuos seleccionados para su posible inclusión en el estudio se les realizarán las pruebas de:

- a- Detección de HBsAg.
- b- Detección de anticuerpos anti-HBc.
- c- Detección de anticuerpos anti-HBs.

Estas pruebas serán realizadas inmediatamente antes de la aplicación de la 1ª dosis de la vacuna y solo serán incluidos en el estudio los individuos con resultados negativos.

Después de realizar la selección y una vez conformados los grupos e iniciada la vacunación, se obtendrán 5 muestras de cada uno de los individuos incluidos en el estudio durante los 18 meses que siguen a la aplicación de la 1ª dosis de la vacuna. Utilizando estas muestras se realizará la detección y cuantificación de anticuerpos anti-HBtgG.

Para la realización de las pruebas incluidas en el estudio pre-vacunal y las pruebas de detección y cuantificación de anticuerpos anti-antígeno de superficie, se obtendrán muestras de sangre periférica en tubos de extracción de 10 ml, la muestra obtenida se centrifugará a 3000 r.p.m. durante 10 minutos y el suero será depositado en dos tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y conservado a - 20 °C hasta cuando los ensayos sean realizados.

Las pruebas de detección de HBsAg, detección de anticuerpos anti-HBc y detección y cuantificación de anticuerpos anti-HBs serán realizadas empleando estuches de reactivos comerciales, de acuerdo con las instrucciones del fabricante y utilizando el equipo MX (ABBOTT Laboratories).



21 OCT. 1997

Las siguientes técnicas y estuches de reactivos serán utilizados:

**Detección de HBsAg.**

Técnica: Inmunoensayo Enzimático.

Referencia: AUSZYME (ABBOTT Laboratories - Diagnostic Division)

Descripción: Inmunoensayo enzimático cualitativo de tercera generación para la detección de HBsAg en suero o plasma. Auszyme es un inmunoensayo enzimático en fase sólida tipo "sandwich" que hace uso de un anticuerpo monoclonal murino anti-HBsAg adherido a la fase sólida del ensayo y un anticuerpo monoclonal murino anti-HBsAg conjugado con peroxidasa de rábano picante utilizado para la detección final de HBsAg (47).

**Detección de anticuerpos anti-HBc.**

Técnica: Inmunoensayo Enzimático.

Referencia: CORZYME (ABBOTT Laboratories - Diagnostic Division)

Descripción: Inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de anticuerpos totales para HBcAg en suero ó plasma. Corzyme es un inmunoensayo enzimático competitivo realizado mediante el empleo de HBc recombinante unido a la fase sólida del ensayo y un anticuerpo policlonal humano anti-HBc conjugado con peroxidasa de rábano picante (48).

**Detección y cuantificación de anticuerpos IgG anti-HBs.**

**a- Detección:**

Técnica: Inmunoensayo Enzimático.

Referencia:

1- AUSAB (ABBOTT Laboratories - Diagnostic Division)

Descripción: Inmunoensayo enzimático para la determinación cualitativa de anticuerpos anti-HBsAg en suero o plasma. AUSAP es un inmunoensayo enzimático en fase sólida tipo "sandwich" realizado mediante el empleo de HBsAg adherido a la fase sólida del ensayo, HBsAg unido a biotina y un anticuerpo policlonal de conejo anti-biotina conjugado con peroxidasa de rábano picante utilizado para la detección final de anti-HBsAg (49).



21 OCT. 1997

**b- Detección y cuantificación:**

Técnica: Inmunoensayo Enzimático.

Referencia:

1. AUSAB (ABBOT Laboratories-Diagnostic Division)
2. AUSAB Panel de Cuantificación (ABBOT Laboratories-Diagnostic Division)

**2- AUSAB Panel de Cuantificación**

Descripción: Panel de 5 sueros estándar con actividad anti-HBsAg (concentración 0, 15, 40, 75 y 150 mUI/ml) empleado para la determinación cuantitativa de la concentración de anticuerpos anti-HBsAg.

Utilizando estos sueros estándar de referencia la concentración de anticuerpos anti-HBsAg, expresada en mUI/ml, es determinada por comparación con una curva estándar generada a partir de la medición de los estándares empleados en duplicado en el inmunoensayo en fase sólida AUSAB (50).

Para el análisis final de resultados, los títulos de anticuerpos IgG anti-HBsAg son expresados en unidades internacionales por mililitro (UI/ml).

**5.1.4. Análisis Estadístico de Resultados**

La comparación de los valores obtenidos para cada uno de los grupos estudiados, será realizada empleando la media geométrica de los títulos de anticuerpos anti-antígeno de superficie, expresados en mUI/ml, como medida de dispersión. Los resultados obtenidos serán analizados utilizando la prueba t de Student para muestras pareadas y la prueba chi cuadrado.

**5.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

- Tubos de extracción de 10ml
- Soportes para tubos de extracción (camisas)
- Agujas
- Torniquetes
- Gradillas
- Tubos de microcentrifuga (1.5ml)
- Pipetas Pasteur
- Micropipetas automáticas (10-100 y 50-200µl)
- Centrifuga
- Congelador (-20C)

21 OCT. 1997

**6. CRONOGRAMA**

**Abril-Mayo/1997** - Revisión Bibliográfica  
- Preparación del Proyecto

**Mayo-Junio/1997** - Revisión Bibliográfica  
- Preparación del Proyecto

**Agosto/1997** - Preselección de Pacientes  
- Estudioprevacunal  
- Vacunación (1ª dosis)

**Septiembre/1997** - Obtención 1ª muestra  
- Procesamiento 1ª muestra  
- Vacunación (2ª dosis)  
- Análisis Preliminar de Resultados

**Octubre/1997** - Obtención 2ª muestra  
- Procesamiento 2ª muestra  
- Análisis Preliminar de Resultados

**Febrero/1998** - Obtención 3ª muestra  
- Procesamiento 3ª muestra  
- Vacunación (3ª dosis)  
- Análisis Preliminar de Resultados

**Marzo/1998** - Obtención 4ª muestra  
- Procesamiento 4ª muestra  
- Análisis Preliminar de Resultados

**Abril-Junio/1998** - Análisis de Resultados  
- Preparación Informe  
- Presentación Informe

AL TÍTULO TERCERO se presenta el presupuesto a partir de la fecha de su expedición.

## PRESUPUESTO

	V. Unitario	V. Total
<b>REACTIVOS</b>		
<b>Cuantificación de enzimas hepáticas</b>		\$ 62,000.00 ✓
Enzima Alanino-amino transferasa	\$ 310.00	\$ 31,000.00
Enzima Asparatato-amino transferasa	\$ 310.00	\$ 31,000.00
<b>Coración Pre-vacunal</b>		\$ 2,800,000.00 ✓
Detección de HBsAg		
Detección de anticuerpos anti-HBcAg		
Detección de anticuerpos anti-HBsAg		
<b>Coración Post-vacunal</b>		\$ 5,472,000.00 ✓
Detección/cuantificación de anticuerpos anti-HBsAg		
<b>MATERIALES</b>		
		\$ 219,680.00 ✓
Reactivos de Extracción	\$ 124.80	\$ 99,840.00
Reactivos	\$ 124.80	\$ 99,840.00
Reactivos	\$ -	\$ -
Reactivos	\$ -	\$ -
Reactivos		\$ 10,000.00
Reactivos		\$ 10,000.00
<b>TIEMPO INVESTIGADORES</b>		
		\$ 11,845,000.00
Dr. Teresa Herrera Mendoza <i>OK</i>	\$ 5,750.00	\$ 5,520,000.00
Dr. Escobar López <i>OK</i>	\$ 5,750.00	\$ 5,520,000.00
Dr. Baquero Robles <i>OK</i>	\$ 5,750.00	\$ 230,000.00
Dr. Inés Saavedra <i>OK</i>	\$ 5,750.00	\$ 575,000.00
<b>COSTO TOTAL</b>		\$ 20,398,680.00



21 OCT. 1997

UNIVERSIDAD  
COLEGIO MAYOR  
DE CUNDINAMARCA

ACUERDO No. 0035

**ARTÍCULO TERCERO .** El presente acuerdo rige a partir de la fecha de su expedición .

Por el presente acuerdo se aprueba y se ratifica el convenio suscrito en la ciudad de Bogotá D.C. el día 10 de junio de 1997.

**COMUNÍQUESE Y CUMPLASE**

**CONSIDERANDO:**

Dado en Santafé de Bogotá, D.C., a los 21 OCT. 1997

Que en virtud de lo establecido en el artículo 10 del Estatuto Orgánico de la Universidad, el Consejo de la Universidad es el máximo órgano de gobierno y tiene la facultad de expedir acuerdos que rigen para toda la institución.

**LA PRESIDENTA,**

que en virtud de lo establecido en el artículo 10 del Estatuto Orgánico de la Universidad, el Consejo de la Universidad es el máximo órgano de gobierno y tiene la facultad de expedir acuerdos que rigen para toda la institución.

Que la evaluación y selección de los investigadores se ajustó a los criterios establecidos en el artículo 10 del Estatuto Orgánico de la Universidad y por lo tanto es necesario aprobarlos para que se desarrollen a partir del primer semestre académico de 1997.

*Alicia Moyano Iregui*  
**ALICIA MOYANO IREGUI**

**LA SECRETARIA,**

que en virtud de lo establecido en el artículo 10 del Estatuto Orgánico de la Universidad, el Consejo de la Universidad es el máximo órgano de gobierno y tiene la facultad de expedir acuerdos que rigen para toda la institución.

*Marta Espinosa de Martínez*  
**MARTHA ESPINOSA DE MARTINEZ**

Que la Universidad de Cundinamarca es una institución de carácter público y tiene la facultad de expedir acuerdos que rigen para toda la institución.

Que el artículo 10 del Estatuto Orgánico de la Universidad establece que el Consejo de la Universidad es el máximo órgano de gobierno y tiene la facultad de expedir acuerdos que rigen para toda la institución.

**ARTÍCULO PRIMERO.** - APROBACIÓN DEL CONVENIO SUSCRITO EN LA CIUDAD DE BOGOTÁ D.C. EL DÍA 10 DE JUNIO DE 1997.