

EL VIRUS DE LA HEPATITIS A

Libia Herrero Uribe, PhD*

RESUMEN

El virus de la hepatitis A se ha clasificado en el género de los Enterovirus, aunque difiere de los virus de este grupo en algunas características biológicas, como su crecimiento lento in vitro y su difícil cultivo, lo cual se discute ampliamente en este trabajo.

Es una enfermedad endémica y está asociada fundamentalmente al saneamiento ambiental y a las condiciones socioeconómicas. A diferencia de la hepatitis B, el paciente no desarrolla un estado crónico en el hígado, aunque a veces pueden darse casos prolongados de valores bioquímicos anormales y algunos cambios histopatológicos. Sin embargo, es un problema de salud pública, sobre todo en los países en vías de desarrollo. En 1986, se notificó 1734 casos de hepatitis viral al Ministerio de Salud de Costa Rica, habiéndose determinado una subestimación importante.

Se cita los diferentes métodos de diagnóstico para esta virosis, siendo el más rápido, sensible y específico la detección de la inmunoglobulina M en el suero del paciente, por medio del radioinmunoensayo.

Se discute la experiencia con el cultivo de este virus a nivel de Costa Rica. [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1987; 8(3):185-191].

El virus de la hepatitis A pertenece a la familia Picornaviridae. Por sus características, se ha clasificado en el género de los Enterovirus, con el número 72 (13). Son virus pequeños de 27 a 32 nm; no presentan membrana fosfolipídica, por lo tanto son resistentes a la acción de los solventes orgánicos como el éter y el cloroformo. Tienen simetría cúbica y su cápside está formada por 60 capsómeros. Contiene una hebra simple de ARN con polaridad positiva, lo que significa que el ácido nucleico viral actúa directamente como mensajero. Los enterovirus se caracterizan por ser muy resistentes a los pH ácidos, lo que les permite cruzar la barrera ácida del estómago (2,22).

Estos virus están formados por una cápside, en donde se han identificado 4 polipéptidos (VP₁, VP₂, VP₃, VP₄). Tres de ellos se encuentran expuestos hacia el exterior, lo que hace que los anticuerpos contra los determinantes antigénicos de estas proteínas sean los responsables de la neutralización del virus, especialmente la VP₁. El cuarto polipéptido (VP₄) se encuentra menos expuesto, lo que lo hace menos importante desde este punto de vista. El virus de la hepatitis A tiene un solo serotipo, y solo infecta al hombre y algunos primates (2, 12, 14).

Este virus tiene varias características que los distinguen del resto de los enterovirus. No produce efecto citopático, es resistente a temperaturas altas, permaneciendo viable hasta 12 horas a 60°C, no hay inhibición de la síntesis de proteínas celulares, por lo tanto, su ciclo de replicación es más lento y la eficiencia de producción viral es baja. Además, la mayoría de las partículas virales producidas se asocian a la célula, y casi no hay virus libre (4, 11).

La hepatitis A es una enfermedad de distribución mundial. En los Estados Unidos, se reporta más de 100.000 casos al año, y en Europa, incluyendo a la Unión Soviética, más de 200.000 (17). En Costa Rica, hubo más de 1734 casos de hepatitis viral durante el año 1986(15). Según datos recientes, que comparan los casos de hepatitis notificados al Ministerio de Salud de los cantones de San Ramón y Palmares y los diagnosticados por el LSU-ICMRT durante los años de 1979 a 1983 en esos mismos cantones, se encontró que existe una subnotificación de más del 40 por ciento (datos no publicados), lo cual puede ser interpolado a todo el país ya los años subsiguientes. Esto demuestra que si además se toma en cuenta los casos subclínicos, especialmente en niños (12), esta enfermedad es de mucha importancia en salud pública en Costa Rica.

La transmisión de esta enfermedad es por la vía fecal-oral, y por lo tanto, la causa de muchos brotes son las aguas y comidas contaminadas, especialmente en los países en vías de desarrollo (17). La transmisión más probable de la hepatitis A es por contacto persona a persona, especialmente en contacto intradomiciliar y entre vecinos (12, 14, 17).
El consumo de mariscos

* Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación y Adiestramiento Médico de la Universidad del Estado de Louisiana (LSU-ICMRT) San José, Costa Rica.

crudos o mal cocinados criados en aguas contaminadas es frecuentemente la fuente de infección, ya que los mariscos, y en especial las "chuchecas", filtran gran cantidad de agua, concentrando de esta forma el virus contenido en las aguas. Otra forma de transmisión es a través del consumo de vegetales mal lavados, que han sido irrigados con aguas contaminadas con materias fecales (14, 17). Estos virus son muy resistentes a los factores ambientales, lo que les permite sobrevivir mucho tiempo en depósitos fecales en el suelo y en comidas no cocinadas (17).

Es una enfermedad endémica en los países en vías de desarrollo y virtualmente el 100 por ciento de la población, a los 10 años de edad, ya ha tenido experiencia con el virus. Sin embargo, se ha demostrado la ocurrencia de epidémicas en países en vías de desarrollo, como en el caso de las descritas en San Ramón y Palmares en Costa Rica. En estos casos, no se demostró una fuente común de contaminación, sino que la epidémica fue por contacto persona a persona (23, 24).

En los países con cuatro estaciones al año, se ha demostrado estacionalidad, especialmente durante el otoño y el invierno (7, 11). En el caso de las epidémicas en San Ramón y Palmares, se demostró que fundamentalmente ocurrieron durante la época seca, período en el cual hay escasez de agua, y por lo tanto el saneamiento ambiental, familiar y personal se minimizan (23, 24). Esta misma característica se ha observado en general para el resto del país.

Esta enfermedad esta asociada fundamentalmente al saneamiento ambiental, a las condiciones socioeconómicas, de higiene y a la densidad de la población (17). En la figura 1 se muestra como en un país como Suecia, en donde las condiciones higiénicas son de alto nivel, la incidencia de hepatitis A es muy baja, en contraste con países que no gozan de estas características (25). Por otro lado, en estos países, se producen brotes epidémicos más o menos frecuentes que afectan a la población de susceptibles que se ha ido acumulando en los intervalos. La infección se adquiere cada vez más tardíamente, alcanzando el pico de la curva de inmunidad recién al llegar a la edad adulta. En esta misma gráfica, se muestra una comparación de la incidencia de la hepatitis A en Costa Rica, durante diez años. Se debe recordar que la década de los 70 se caracterizó por cambios muy importantes en el saneamiento ambiental del país,

como letrización, agua potable, educación y en general medicina preventiva, trayendo cambios muy importantes en el descenso de la mortalidad infantil. Esto se debió fundamentalmente a la disminución de la morbilidad y mortalidad por diarrea y enfermedades prevenibles por vacunación (16).

Aunque la infección ocurre por la ingestión del virus, no se ha podido comprobar que el primer sitio de replicación sea el tracto gastrointestinal. El virus se detecta primeramente en el hígado y parece ser excretado al intestino por medio de la bilis (12, 17). La mayoría de los casos (más de un 60%), en especial en los niños, ocurren en forma leve o asintomática, aumentando la severidad de la enfermedad con la edad. La hepatitis A es usualmente una enfermedad leve, autolimitante, aunque algunas veces puede causar casos fulminantes y llevar a la muerte. La hepatitis A no llega a desarrollar un estado crónico en el hígado, aunque a veces pueden darse casos prolongados de valores bioquímicos anormales y algunos cambios histopatológicos. Pero aún en estos casos, la excreción del virus no dura más de 4 semanas, pues el virus es eliminado rápidamente por el organismo. Por lo tanto, no existen estados crónicos de la enfermedad (5, 6, 12, 17).

La Figura 2 muestra los eventos que ocurren cuando hay una infección por el virus de la hepatitis A. Como se puede observar, la eliminación del virus por las heces ocurre antes de que la sintomatología se manifieste. Luego del inicio de la ictericia, lo que se eliminan por heces son fundamentalmente complejos antígeno anticuerpo (12, 17). Por estas dos razones, el acostumbrado aislamiento del enfermo icterico no es necesario, cuando las condiciones de higiene son adecuadas (17) ya que en ese momento las heces del paciente han dejado de ser infecciosas. A diferencia de las otras hepatitis, la transmisión de HAV por sangre no es importante, aunque se ha demostrado este tipo de transmisión en pocos casos (12).

Para el diagnóstico de la hepatitis A, existen varias posibilidades. El método de escogencia es la determinación de la IgM en el suero del paciente, por medio de radioinmunoensayo (RIA) o ELISA (6). También se puede determinar la presencia del antígeno en las heces, utilizando la inmunoelectromicroscopía (IEM) para visualizar las partículas virales (7). El problema de emplear estas técnicas en las heces es que la eliminación de partículas virales es mínima o nula cuando ya el paciente

esta sintomático; por lo tanto, se puede incurrir en un error de diagnóstico. Estas técnicas se utilizan con gran acierto en trabajos de investigación, pero no tienen mucho valor para el diagnóstico etiológico. Como se puede observar en la Figura 2, la técnica de escogencia para hacer el diagnóstico es la determinación de la IgM sérica en el paciente, demostrando así una infección primaria y aguda, de una forma específica y en un período de tiempo más largo, asegurándose, de esta forma, un diagnóstico certero (12, 14).

La hepatitis como entidad clínica fue descrita desde el siglo 17 (14), pero no fue hasta 1967 en que Deinhart y colaboradores (5) lograron transmitir el virus por primera vez a marmosetas. Seis años más tarde, Feinstone y colaboradores (7) visualizaron partículas al microscopio electrónico, en las heces de un paciente con hepatitis. En ese mismo año, Provost y Hilleman (18) lograron aislar en marmosetas el virus de la hepatitis A de una biopsia de un paciente. Luego de treinta y un pasaje en este animal, estos mismos investigadores lograron cultivar por primera vez el virus *in vitro*, utilizando cultivos primarios de hígado de marmosetas y luego en una cepa celular de riñón de mono Rhesus (Frhk-6). El virus propagado en éstas células no producía efecto citopático (ECP), por lo que su detección se realizó por medio de la determinación de los antígenos específicos del virus en los extractos celulares utilizando la técnica de inmunofluorescencia. En 1979, Frosner y colaboradores (11) lograron aislar el virus a partir de las heces infectadas en una línea celular de hepatoma, la cual produce el antígeno de superficie de la hepatitis B. En este caso, tampoco se observó ECP, determinándose el virus en los extractos celulares por medio de RIA a las 4 semanas post infección. Años después, Daemer et al. (4) lograron aislar el virus en células de riñón de mono verde africano (AGMK), directamente de las heces de un paciente, en donde tampoco se observó ECP, y la detección del virus se hizo por técnicas indirectas. Durante los últimos años, varios autores (4, 8, 9, 11, 18, 19) han reportado el aislamiento y la propagación del virus de la hepatitis A en varios sistemas celulares. En estos momentos, se utiliza una línea celular de fácil adquisición y mantenimiento en el laboratorio, línea celular de riñón fetal de mono Rhesus (FrhK-4) (9). En todos las líneas celulares utilizadas hasta el momento, no se ha logrado observar efecto citopático, y la primera detección de los antígenos específicos del virus se logra determinar después de las

primeras 4 o más semanas de haber sido infectados los cultivos. La propagación seriada de los virus aislados permite que por medio de la adaptación, el título del virus aumente y el tiempo de detección de sus antígenos específicos en el extracto celular se acorte.

El virus de la hepatitis A no produce efecto citopático. Hay tres técnicas para poner en evidencia la presencia del virus en el cultivo. El RIA es el método más usado, con el inconveniente que para que la prueba dé resultados positivos se necesitan de 10^5 a 10^7 partículas virales en el cultivo (12), cantidad de virus difícil de obtener en el primer aislamiento. También se emplea la inmunofluorescencia, con el inconveniente que puede detectar antígenos del virus inoculado y no necesariamente pone en evidencia al virus infectivo o a la progenie viral. Para solucionar este problema, se deben probar los cultivos seriadamente, en espera de ver un aumento en el número de células fluorescentes para determinar así la replicación del virus (19). La otra técnica que se emplea es la microscopía electrónica, la cual es costosa y especializada, y para obtener una mayor sensibilidad, se debe concentrar la muestra por medio de la ultracentrifugación. Si se tiene el microscopio electrónico, la tecnología apropiada es la inmunoelectromicroscopía, que es más sensible, específica y rápida (2, 7).

Ya que la dificultad de cultivar este virus es obvia, porque el virus no produce efecto citopático y su crecimiento es lento y poco eficiente en las células *in vitro*, es fácil preguntarse cuál es el objeto de cultivar el virus, si se puede realizar un diagnóstico serológico certero en forma rápida y segura. El aislamiento de cepas de HAV sirve para comparar desde el punto de vista antigénico, los diferentes virus aislados que circulan por el mundo, ya que es fundamental a la hora de pensar en la producción de una vacuna. Por otro lado, los cultivos celulares sirven también para realizar pasajes seriados, y así lograr la atenuación, adaptación y acortamiento del ciclo de replicación del virus. Esto tiene el fin de adaptar y atenuar una cepa que pueda replicarse con gran eficiencia en células diploides humanas, por ejemplo, las cuales son las más adecuadas para la producción de una vacuna (21). Por medio de los cultivos celulares, se ha logrado crecer los virus en grandes cantidades, para luego poder realizar los estudios bioquímicos y genéticos. Recientemente, Provost y colaboradores (20) lograron adaptar una cepa de virus a células LLCMK², la cual no produce efecto citopático, pero la producción de virus se logra en un periodo de 3 semanas. Anderson

(1) y Cromeans y colaboradores (3) han reportado la obtención de cepas que producen efecto citopático y con ciclos de replicación muy cortos. Esto aumenta las posibilidades de producir una vacuna más fácilmente y más barata.

La vacuna ideal contra esta virosis sería una vacuna viva atenuada, que se pudiera administrar oralmente en conjunto con la de la polio. Para mayor efecto, debería darse temprano en la vida, después que los anticuerpos maternos declinen. Esta clase de vacuna tendría el inconveniente de la interferencia con otros enterovirus que normalmente circulan por la población (6, 8, 21). Sin embargo, la utilización de la vacuna oral de la polio ha tenido resultados excelentes, erradicando esta enfermedad de Costa Rica desde 1974 (16).

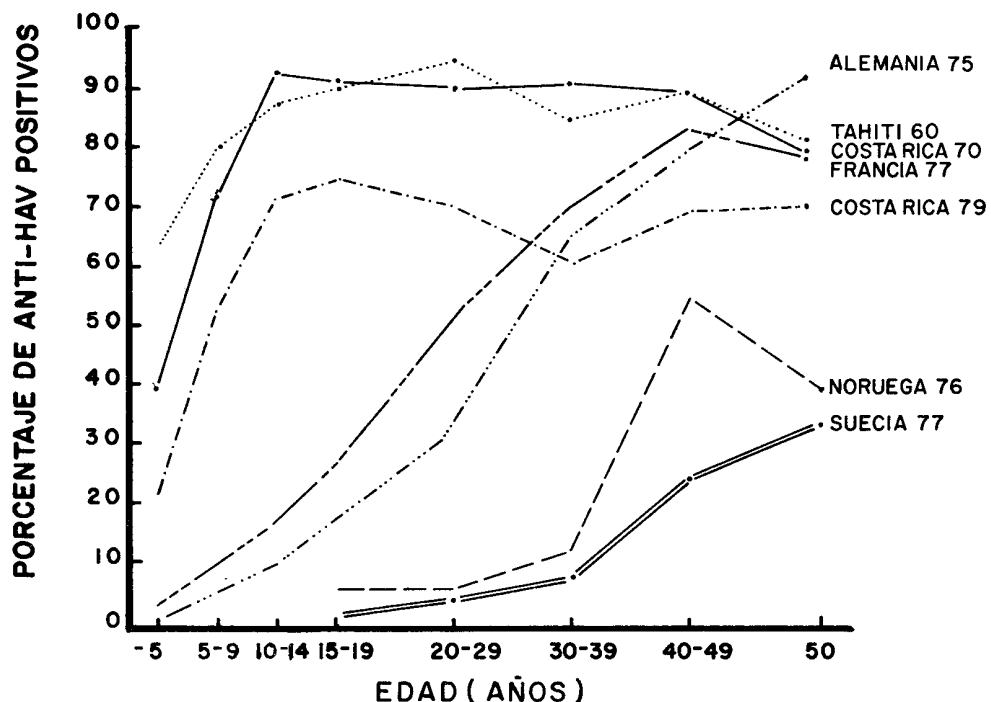
En estos momentos, hay reportes en la literatura científica de dos clases de vacunas producidas en fibroblastos humanos, una vacuna atenuada y otra de virus inactivado. Según estos reportes, las vacunas son inmunogénicas y con reacciones mínimas en los animales que fueron vacunados (10, 21). Sin embargo, uno de los problemas que existen para autorizar la vacuna atenuada (10) es que no se han hecho las pruebas definitivas para probar cuál es la estabilidad ge-

nética de la cepa empleada. Por otro lado, una de las razones por las cuales las vacunas no han sido autorizadas es porque podrían significar un riesgo económico para las compañías productoras, ya que en los países que podrían adquirirlas en grandes cantidades, la hepatitis A no se considera una enfermedad de prioridad en salud pública, por cuanto esta enfermedad está ligada a problemas de higiene ambiental y condiciones socioeconómicas bajas.

Con el fin de contribuir al estudio de las cepas de este virus que circulan por las diferentes poblaciones del mundo, se ha trabajado en el laboratorio de Virología del LSU-ICMRT, logrando el aislamiento de una cepa del virus de la hepatitis A de un caso subclínico. Se determinó el antígeno específico del virus por medio de RIA en el extracto celular después de tres pasajes ciegos, los dos primeros de 60 días y el tercero de 35 días (datos no publicados). Esta experiencia concuerda con la de diferentes laboratorios en otros países (4, 9, 19).

El aislamiento de cepas es muy importante, pues se está en la búsqueda de cepas atenuadas naturales que puedan emplearse con mejor resultado como vacunas (22).

Figura 1. Prevalencia de anticuerpos contra la hepatitis A en diversos países industrializados y en vía de desarrollo



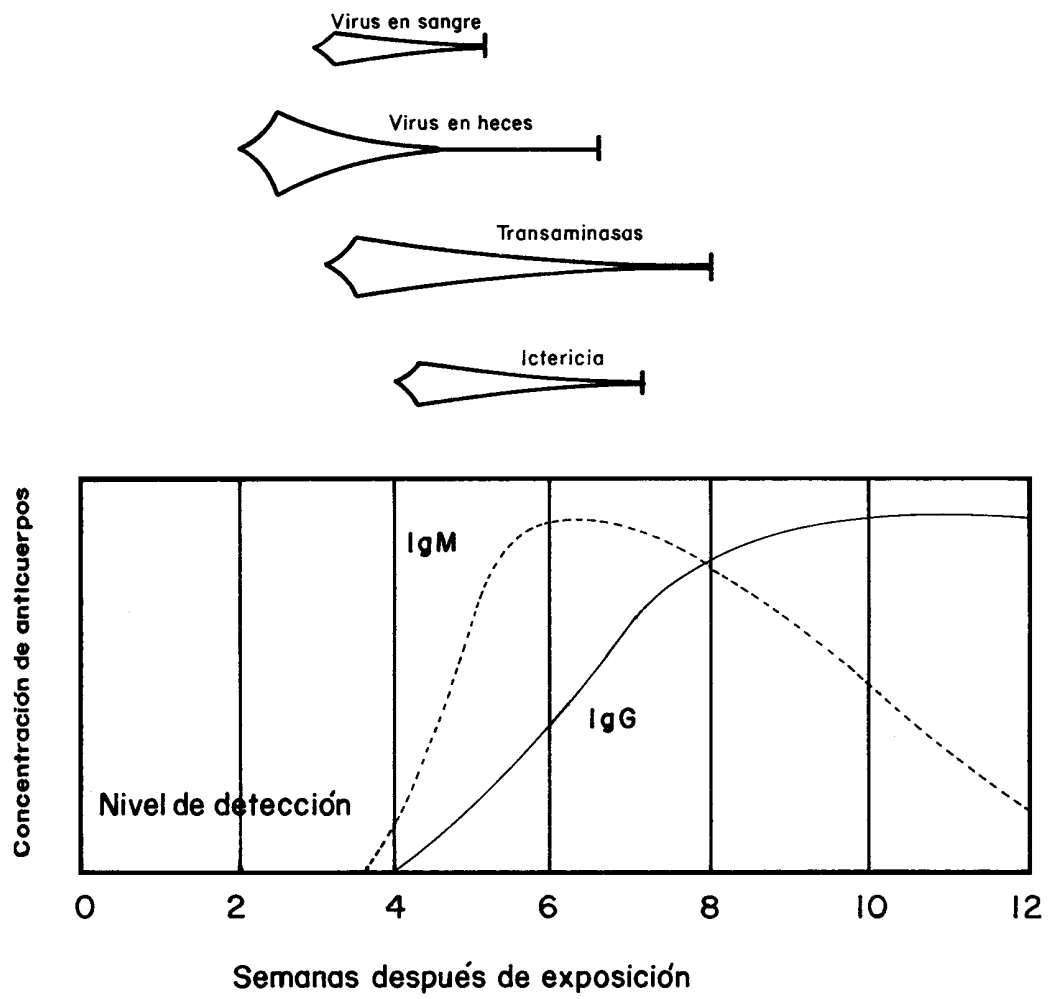


Figura 2. Eventos inmunológicos y biológicos asociados con hepatitis A viral.

Tomado de:
 Virology. Fields, B.N. Raven Press, New York, 1985, pag. 1463

ABSTRACT

Viral hepatitis A is a major endemic public health problem, especially in developing countries. According to its biophysical and biochemical properties, the virus has been classified as a member of the genus Enterovirus, within the family Picornaviridae. Unlike the rest of the viruses of this group, its replication in vitro is very slow and difficult; these aspects are discussed in this review. Acute hepatitis A is generally considered to be a mild and self-limited disease. Fulminant hepatitis failure rarely occurs. In 1986, 1734 cases of viral hepatitis were notified to the Costa Rica Public Health Ministry, and other studies have determined an important subnotificación. The different diagnostic methodologies are discussed; the more useful, specific and rapid is the determination of immunoglobulin M in the patient's serum. The experience in isolating hepatitis A in Costa Rica is discussed.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, D.A. Cytopathology. Plaque Assay, and Heat Inactivation of Hepatitis A Virus Strain HM175. *J. Med. Virol.* 1987; 22:35-44.
2. Coulepis, A., Locarmini, S.A., Westaway, E.6., Tannock, G.A. y Gust, I.D. Biophysical and Biochemical Characterization of Hepatitis A virus *Intervirology* 1982; 18:107-127.
3. Cromeans, T., Sobsey, M.D. y Fields, H. Development of a Plaque Assay for a Cytopathic, Rapidly Replicating Isolate of Hepatitis A Virus. *J. Med. Virol.* 1987; 22:45-56.
4. Daemer, R.J.: Feinstone, S.M.; Gust. I.D.; Purcell, R.H. Propagation of human hepatitis A virus in African green monkey cell culture: primary isolation and serial passage. *Infect. Immunity* 1981 ;32: 388-393.
5. Deinhardt, F., Holmes, A.W. Capps, R.B, and Popper, H. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passage and description of liver lesions, *J. Exp. Med.* 1967; 125: 673-687.
6. Deinhardt, F., Abb, J., Gauss-Muller, V., Ven der Helen, K, Roggendorf, H. + Scheid, R. Viral Hepatitis A: Virus, Disease, and Control. En: *Applied Virology*. Ed. E. Kurstak Academic Press.1984; 365-376.
7. Feinstone, S.M.; Kapikian, A.Z.; Purcell, R.H. Hepatitis A. detection by immune electron microscopy of a virus like antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026-1028.
8. Feinstone, S.M. Development of Hepatitis A Vaccines. En: *Viral Hepatitis and AIDS*. Proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and AIDS. Ed. Villarejos, V.M., Trejos Hnos. San José-Costa Rica, 1987; pp. 191-196.
9. Flehmig, B. Hepatitis A virus in cell culture.I. propagation of different hepatitis A virus isolates in a fetal rhesus monkey kidney cell line (FRhK-4), *Med. Microbiol. Immunol.* 1980;168: 239-248.
10. Flehmig, B., Haage, A. y Pfisterer, M. Immunogenicity of a Hepatitis A Virus Vaccine. *J. Med. Virol.* 1987:22: 7-16.
11. Frosner, G. G; Deinhardt, F. Scheid, R.: Gauss-Muller, V.; Holmes, N.; Messelberger, V.; Siegl, G.; Alexander, J.J. Propagation of human hepatitis A virus in a Hepatoma cell line, *infection* 1979;7: 303-305.
12. Hollinger, B. Hepatitis Viruses. Pan I: Hepatitis A virus. En *Virology*, Ed. BW. Fields at al., Raven Press, N.Y. 1985; 1379-1383.
13. Melnick, J.L. Classification of Hepatitis A. *Intervirology* 1982; 18:105-106.
14. McCollum, R.W. Viral Hepatitis. En: *Viral Infections of Humans*. Ed. A.S. Evans. John Willey & Sons, London, N.Y. 1976; 235-249.
15. Ministerio de Salud. Semana Epidemiológica 1986; 15(52).
16. Mohs, E. Infectious Diseases and Health in Costa Rica: The development of a new paradigm. *Pediatric Inf. Dis.* 1982:1, 212-216.
17. Papaevangelou, G. Epidemiology and control of Hepatitis A. En: *Viral Hepatitis and AIDS*. Proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and AIDS. Editor: Villarejos, V.M., Editorial Trejos Hnos, San José, Costa Rica, 1987; 163-176.
18. Provost, P.J. y Hilleman, M.R. Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc. Soc. Exp Biol. Med.* 1979; 160: 213-221.
19. Provost, P.J., Paula A. Giesa, William J. McAleer, and Maurice R. Hilleman. Isolation of Hepatitis A virus in vitro in Cell Culture Directly from Human Specimens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1981; 167:201-206.

20. Provost, P.J., Hughes, J.V., Miller, W.J., Giesa, P.A., Banker, F.S. y Emini, E.A. An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J. Med. Virol.* 1986; 19: 23-31.
21. Provost, P.J. Hepatitis A vaccine development: A review. En: *Viral Hepatitis and AIDS*. Proceedings of the International Symposium on Viral Hepatitis and AIDS. Editor: Villarejos, V.M., Editorial Trejos Hnos., San José-Costa Rica, 1987; 185-190.
22. Siegl, G, Frosner, G., Gauss-Muller, V., Tratschin, J.A. y Deinhardt, F. The Physicochemical Properties of Infections hepatitis A virions. *J. Gen Virol* 1981; 57:331-341.
23. Villarejos, V.M. William Pelon, Bernardo Picado, Juan Gmo. Ortiz, Rodrigo Jimenez and Hugo Navas Epidemiologic Investigation of an Outbreak of Infectious Hepatitis in Costa Rica. *Am. J. Epidemiol.* 1966; 84: 457-466.
24. Villarejos Victor M., Jorge A. Arguedas, Alvaro Gutiérrez, Eduardo Eduarte, Gilberto Vargas A. and Jorge A. Osborne. Hepatitis Epidemic in a Hyperendemic Zone of Costa Rica. *Am. J. Epidemiol.* 1972; 96:361-371.
25. Villarejos Victor M. Prevencion y Control de las Hepatitis Virales. En: *Control y Erradicación de Enfermedades Infecciosas. Un simposium Internacional*. PAHO N 1, 1985; 221 -229.