

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE  
HIDALGO  
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
DR. IGNACIO CHAVEZ

***“RESPUESTA INMUNE A LA VACUNA INACTIVADA DE  
HEPATITIS A EN NIÑOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE  
INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1”***

**Para obtener el título de: Maestro en Ciencias Médicas**

Tutor: Dr. José Guillermo Vázquez Rosales \*

Alumno: Dra. Ileri García Juárez\*\*

Cotutor: Dr. Alain Rodríguez Orozco \*\*\*

Colaboradores: Dr. Francisco Blanco Favela.\*\*\*\*

QBP Ma Teresa Alvarez y Muñoz

\* Pediatra-Infectólogo. Servicio de Infectología Hospital de Pediatría CMN SXXI

\*\* Alumno de Maestría en Ciencias Médicas

\*\*\* Inmunólogo. Profesor Investigador Posgrado “Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas”

\*\*\*\* Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología. Hospital de Pediatría CMN SXXI

\*\*\*\*\* Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias  
Jefe del laboratorio de Virología. Hospital de Pediatría CMN SXXI

Septiembre 2005

# INDICE

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>I. Antecedentes</b>	<b>3</b>
<b>II. Planteamiento del problema</b>	<b>7</b>
<b>III. Justificación</b>	<b>8</b>
<b>IV. Hipótesis</b>	<b>8</b>
<b>V. Objetivos</b>	<b>9</b>
<b>VI. Material y Métodos</b>	<b>10</b>
<b>Criterios de selección</b>	<b>10</b>
<b>Definición operacional de variables</b>	<b>11</b>
<b>Descripción general del estudio</b>	<b>12</b>
<b>Análisis de datos</b>	<b>13</b>
<b>VII. Factibilidad y Aspectos éticos</b>	<b>14</b>
<b>VIII. Recursos humanos físicos y financiamiento</b>	<b>14</b>
<b>IX. Cronograma de actividades</b>	<b>15</b>
<b>Resultados</b>	<b>16</b>
<b>Discusión</b>	<b>24</b>
<b>Conclusiones</b>	<b>29</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>30</b>
<b>Anexo 1 Hoja de recolección de datos</b>	<b>35</b>
<b>Anexo 2: Consentimiento Informado</b>	<b>36</b>
<b>Anexo 3. Clasificación inmunológica</b>	<b>37</b>
<b>Anexo 4. Descripción de técnicas de laboratorio</b>	<b>38</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL DR. JOSE GUILLERMO VAZQUEZ ROSALES.**

**A MIS PAPAS.**

Por ser la milésima vez que apoyan mis locuras

**Al Dr. Fortino Solórzano Santos.**

Gracias por abrirme la puerta y seguir creyendo en mí.

**Gracias al Dr. Francisco Blanco y todos mis amigos de los laboratorios de Virología y de Inmunología** (Vicky, lupita, Luis, Otón y Mario).

**A mi amigo mío** a quién algún día le pagaré mi deuda.

**Agradezco al Dr. Benigno Figueroa, al Dr. Farías y al Dr Aláin.**

## RESUMEN

**Introducción.** El virus de Hepatitis A (VHA) es causa importante de morbilidad y mortalidad en grupos de riesgo. En pacientes infectados por VIH se ha documentado infección persistente por VHA. La inmunodepresión causada por el VIH-1 disminuye la capacidad del huésped para responder a la inmunización activa por cualquier estímulo vacunal y el logro de seroprotección es menor en comparación con sujetos no infectados. Con la progresión de la enfermedad la respuesta a la administración de la vacuna y a dosis de refuerzo es pobre, por lo que la habilidad a responder a nuevas vacunas y la magnitud de la memoria declina.

**Objetivo.** Evaluar la respuesta inmune humoral y celular a la vacuna inactivada de Hepatitis A en un grupo de niños infectados por VIH-1 y correlacionar éstas con el estado inmunológico del paciente.

**Material y Métodos.** Diseño cuasi-experimental. Se incluyeron pacientes con diagnóstico de VIH, entre 1 a 16 años, sin antecedente de haber recibido la vacuna de Hepatitis A. Se tomó muestra sanguínea para identificación de anticuerpos IgG específicos contra-VHA, a fin de identificar antecedente de infección con el virus. Se excluyeron los positivos. En un tiempo cero se exploró el porcentaje de linfocitos CD4+ que expresan las moléculas de activación linfocitaria (CD25 y CD69). Después de la toma se administró una primer dosis de vacuna inactivada para Hepatitis A

A los seis meses se aplicó la segunda dosis. A las 8 semanas de la primer y segunda dosis de vacuna se evaluaron en forma cuantitativa títulos de anticuerpos específicos contra-VHA (respuesta inmune humoral) y porcentaje de linfocitos CD4+, que expresan las moléculas de activación linfocitaria (CD25 y CD69) en respuesta al estímulo del antígeno vacunal *in vitro*. (Respuesta inmune celular). Se realizó cuantificación de linfocitos T CD4+, al inicio del estudio y a los seis meses. Se consideró como títulos de anticuerpos protectores > 20 mIU/ml. Para el análisis estadístico se usaron prueba de T pareada, prueba de rangos de Wilcoxon y coeficiente de correlación de Spearman.

**Resultados.** Se vacunaron 25 pacientes, media de edad: de 5.2 años (DS  $\pm$ 2.8). Al final del esquema el grupo de supresión severa tuvo anticuerpos en títulos protectores el 75%, mientras que los pacientes con supresión moderada y sin supresión lo hicieron el 100%. El porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresaron CD25 y CD69 lo hicieron en forma significativa desde la primera dosis. Se encontró correlación entre CD4+ absolutos y títulos de anticuerpos con un valor de  $p < 0.007$ . Se reportó como evento adverso relacionado a vacunación fiebre en dos pacientes.

**Discusión.** La aplicación de vacuna de Hepatitis A en niños con VIH/SIDA es bien tolerada. En el grupo de pacientes sin evidencia de supresión y de supresión moderada la respuesta inmune humoral es semejante a la presentada por niños sanos. Recomendamos la vacunación en pacientes con cifra de CD4+ >de 14%. Para el grupo de supresión severa deberá considerarse el uso de dosis adicional. La respuesta celular es significativa desde la primera dosis de vacuna en los tres grupos de categoría inmunológica.

## ABSTRACT

**Introduction.** Hepatitis A virus (HAV) causes important morbidity and mortality in risk groups. In HIV infected patients it's been documented persistent infection. The Immunosuppression caused by the HIV virus diminished the host capacity to respond to immunization, and the seroprotection trend to be minor in HIV infected patients. Once the disease shows progression, the response to vaccine and the booster doses is poor, so the ability to respond to new vaccines and the memory became diminished.

**Objective.** To assess humoral and cellular response to hepatitis A inactive vaccine in HIV infected children and its correlation with the immunologic state of the patients.

**Material and Methods.** Quasi-experimental design. Were included patients with HIV between 1 to 16 years old, without previously Hepatitis A vaccination. Blood samples were taken to identify Hepatitis A IgG antibody titers, in order to establish criteria for previous infection. The positive were excluded. In a zero time, the percentage of lymphocytes which express the lymphocyte activation molecules (CD25 and CD69), were evaluated, then the first dose of Hepatitis A vaccine was administered and 6 months later the second dose was given. 8 weeks after the first and the second doses, specific hepatitis A antibody titers (humoral response) and the percentage of lymphocytes which express the lymphocyte activation molecules (CD25 and CD69) as a response to *in vitro* vacunal stimulation (Cellular response). CD4+ T lymphocytes count was measured at the beginning of the study and 6 months later. Antibody titers were considered as protective  $> 20$  mIU/ml. Statistical analysis was made with the Student's paired *t*-test, Wilcoxon test and Spearman correlation coefficient.

**Results.** 25 patients were vaccinated, the age average was 5.2 (DS  $\pm 2.8$ ). At the end of the vaccination schedule, the 75% patients of the severe suppression group had protective antibody titers, in patients with moderate immune suppression and in those without suppression seroprotective titers were detected in all of them. The percentages of CD4+ T lymphocytes which express the lymphocyte activation molecules (CD25 and CD69) were significant since the first dose of vaccine. A correlation between the CD4 + count and the antibody titers was founded  $p < 0.007$ . The vaccination showed fever as side effect.

**Discusión.** The hepatitis A vaccine administration in HIV/AIDS children is well tolerated. In the moderate and without suppression group the humoral response is like to those observed in healthy children. We recommend the hepatitis A vaccination in patients with CD4+ count  $> 14\%$ . For severe immune suppression group and additional dose must be considered. The cellular response was significant since the first dose of vaccine in the three groups of immune category.

## I. ANTECEDENTES

El virus de Hepatitis A (VHA), agente etiológico de la hepatitis infecciosa es un picornavirus, cuyo material genético es RNA. Su infección puede ser asintomática o bien, ocasionar un síndrome de hepatitis aguda con varios grados de severidad, esta diversa respuesta del huésped a la infección tiene relación con la edad y el estado inmunológico del paciente y da lugar a significativos índices de morbilidad y mortalidad. <sup>(1,2)</sup> Por ejemplo, la hepatitis fulminante por VHA, con una letalidad de 0.3%, puede ser mas alta entre los individuos de mayor edad, llegando hasta 2% en los mayores de 40 años. <sup>(2)</sup>

La infección por VHA es considerada como un problema de salud a nivel mundial, sin embargo; como resultado de la mejoría en las medidas higiénicas en países desarrollados, la prevalencia de la enfermedad ha disminuido, principalmente en la infancia, lo que da como resultado un incremento en la población susceptible en adolescentes y adultos. <sup>(3)</sup>

En México, el comportamiento epidemiológico de la infección ha cambiado. Hace 20 años la seroprevalencia para VHA era cercana al 100% en niños de 1-5 años de edad. <sup>(4,</sup>  
<sup>5,6)</sup> Información actual ha mostrado que el porcentaje de seroprevalencia es del 40% para este mismo grupo, del 70% en los niños de 6-10 años y del 80% en niños de 11-16 años. <sup>(7,</sup>  
8, 9,10)

La introducción de la vacuna inactivada ha logrado disminuir la incidencia de la enfermedad, su uso provee seguridad e inmunogenicidad adecuada a su administración.

(11,12,13,14,15,16,17). Ha sido recomendada por el Comité Consejero sobre Prácticas de Inmunizaciones del Centro para el Control de Enfermedades de EUA (ACIP) para su uso en áreas geográficas endémicas y en grupos de alto riesgo. (18, 19, 20,21)

Por otra parte la infección por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) lleva a una disfunción del sistema inmune, que conduce a alteraciones variadas de respuesta celular y humoral lo que incrementa el riesgo de infección por una gran variedad de patógenos, entre ellos el VHA. (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30,31)

Los pacientes con infección por VIH-1 no son capaces de responder adecuadamente al proceso infeccioso por el VHA, lo que permite que la sintomatología y la duración de la viremia sean mayores que en pacientes no infectados, incluso se ha documentado el desarrollo de infección persistente por VHA con elevación prolongada de cifras de aminotransferasas en coinfección con VIH. (32,33)

En general la inmunodepresión causada por el VIH-1 disminuye la capacidad del huésped para responder a la inmunización activa inducida por cualquier estímulo vacunal y el logro de seroprotección es menor en comparación a sujetos no infectados. (34) En los niños infectados por VIH-1 el porcentaje de respuesta difiere en relación al tipo de vacuna aplicada y al grado de deterioro del sistema inmune, siendo mayor la inmunoprotección cuando la inmunización activa es administrada en el momento en que el sistema inmune se encuentra preservado. En la actualidad, la ACIP recomienda la inmunización rutinaria en niños infectados por VIH-1, sin embargo las vacunas con virus vivos atenuados deben aplicarse solamente cuando el porcentaje de linfocitos CD4+ sea superior al 25%. (22,35)

El desarrollo y la longevidad de la respuesta de anticuerpos en pacientes infectados por VIH-1 son poco claros. Sin embargo con la progresión de la enfermedad la respuesta a la administración de la vacuna y a las dosis de refuerzo es pobre, por lo que la habilidad para responder a nuevas vacunas y la magnitud de la memoria a inmunógenos previamente administrados declina, el título de anticuerpos protectores disminuye más rápidamente que en individuos inmunocompetentes y es por esto que en algunos casos se utiliza la administración más frecuente de dosis de refuerzo. <sup>(36, 37, 38,39)</sup>

En la actualidad existen dos vacunas de virus completo inactivado para hepatitis A las cuales están disponibles en México. Para producir la vacuna, el virus adaptado al cultivo de células de fibroblastos humanos, se purifica a partir de lisado de células, se inactiva con formalina y se adsorbe con un adyuvante de hidróxido de aluminio.

En el huésped inmunocompetente es altamente inmunogénica, en pacientes menores de 16 años el 97% consiguen títulos de anticuerpos protectores ( $> 20$  mIU/ml) a los 24 días de administración de la primera dosis, llegando esta cifra a ser hasta el 100% después de la segunda dosis. <sup>(40, 41, 42, 43,44)</sup>

La inmunidad celular juega un papel importante en la respuesta del huésped a la infección por VHA y parece contribuir a la protección a largo plazo pero esto aún no ha sido evaluado adecuadamente. La respuesta proliferativa específica de las células T esta presente en etapas muy tempranas de la enfermedad y es responsable tanto de la eliminación del virus durante la infección aguda como de la lisis de los hepatocitos infectados. Estudios recientes en adultos inmunocompetentes indican que la vacuna inactivada de hepatitis A induce una respuesta proliferativa de células T que dura al menos cinco meses después de la vacunación y que es acompañada de la producción de interferón gama. <sup>(45)</sup>

La inmunización de rutina en los pacientes infectados por VIH-1 contra los diferentes agentes infecciosos es compleja por la eficacia reducida de algunas vacunas y los riesgos inherentes a la aplicación de microorganismos vivos en este grupo de pacientes. La vacuna inactivada de hepatitis A no es recomendada rutinariamente, sin embargo ha demostrado seguridad y se espera que su uso disminuya la tasa de incidencia de Hepatitis A en personas infectadas por HIV-1 cuando están en riesgo de adquirirla, principalmente en países de baja prevalencia para hepatitis A. <sup>(46)</sup> Existen estudios que han mostrado que puede ser administrada con seguridad en adultos infectados por VIH-1 susceptibles (anticuerpos anti-VHA ausentes en suero). Sin embargo, solo el 40% de ellos consiguen niveles protectores de anticuerpos, especialmente en etapas avanzadas de la enfermedad.

(47,48, 49, 50, 51, 52,53)

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La hepatitis A es una enfermedad infecciosa prevenible por vacunación, la cual es recomendada para grupos de alto riesgo donde la morbilidad y la letalidad son mayores, principalmente en adolescentes, adultos jóvenes y pacientes con alteraciones en la inmunidad como los infectados por el VIH. Además, en la actualidad, se ha documentado un incremento en el número de susceptibles en la edad pediátrica debido a los cambios en el comportamiento epidemiológico de la enfermedad en nuestro país.

Los cambios inmunológicos en el paciente infectado por VIH-1, conducen a que la respuesta del huésped a las diferentes vacunas varíe en relación a su estado inmunológico, por lo cuál es necesario evaluar la magnitud de la respuesta celular y humoral específicas a la vacuna inactivada de hepatitis A y su comportamiento dependiendo del grado de inmunosupresión de cada individuo, a fin de caracterizar la respuesta inmune específica que induce la vacuna inactivada de hepatitis A en este grupo de pacientes.

Por lo anterior realizamos las siguientes preguntas de investigación.

1. ¿Cuál es el porcentaje de seroprotección posterior a la aplicación de dos dosis de vacuna inactivada contra el VHA en pacientes pediátricos infectados por VIH-1?
2. ¿Cuál es el comportamiento de la respuesta inmune celular, evaluada mediante moléculas de activación linfocitaria en muestras antes y después de la aplicación de vacuna inactivada contra el VHA?
3. ¿Existe correlación entre el número de linfocitos CD4+ y la concentración de anticuerpos contra VHA obtenidos en cada muestra posterior al estímulo vacunal?

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La producción de anticuerpos y la longevidad de la respuesta inmune en pacientes infectados por VIH-1 es pobre y con la progresión de la enfermedad la habilidad del huésped para responder al estímulo vacunal, la magnitud de la respuesta y el título de anticuerpos protectores disminuye más rápidamente que en individuos inmunocompetentes.

No se han realizado estudios previos en pacientes pediátricos infectados por VIH-1 que evalúen la magnitud de la respuesta inmune humoral y que caractericen a la respuesta inmune celular a la vacuna inactivada de hepatitis A y su correlación con el estado inmunológico de los pacientes infectados por VIH-1, a fin de definir en que momento se logra una respuesta protectora con su administración.

### **IV. HIPÓTESIS**

1. El porcentaje de seroprotección en niños infectados con VIH-1 inmunizados con dos dosis de vacuna contra VHA será al menos del 50%.
2. El porcentaje de moléculas de activación linfocitaria expresadas por los linfocitos T CD4+ encontrados en la muestra basal se incrementarán al menos cinco veces en la determinación al final del esquema de vacunación.
3. Existe una correlación positiva entre la concentración de anticuerpos contra el VHA y el número de células CD4+ presentes en la muestra del paciente.

## **V. OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Evaluar la respuesta inmune humoral y celular a la vacuna inactivada de Hepatitis A en un grupo de niños infectados por VIH-1 y su correlación con la categoría inmunológica del paciente.

### **Objetivos específicos**

1. Cuantificar la concentración de anticuerpos contra el VHA generados posterior a cada dosis de aplicación de la vacuna inactivada de Hepatitis A en un grupo de niños infectados por VIH-1.
2. Cuantificar la expresión de las moléculas de activación (CD25 y CD69) en linfocitos T CD4+ de un grupo de niños infectados por VIH-1 expuestas al antígeno vacunal *in vitro* posterior a cada dosis de vacuna.
3. Establecer la correlación existente entre el número de linfocitos CD4+ presentes en cada sujeto y la concentración de anticuerpos específicos generados por la vacuna inactivada de Hepatitis A.

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **Lugar donde se realizará el estudio.**

El presente trabajo se llevó a cabo en el Hospital de Pediatría del CMN SXXI, en los laboratorios de Virología y de Inmunología. Los pacientes fueron de la Clínica de VIH/SIDA del Servicio de Infectología.

### **Diseño de la Investigación**

- a) Por la captación de la información: prospectivo
- b) Por la medición del fenómeno en el tiempo: longitudinal.
- c) Por la dirección del análisis: cohorte
- d) Por la ceguedad en la aplicación y evaluación de una maniobra: abierto
- e) Por el control de la maniobra experimental del observador: cuasi-experimental

**Diseño del estudio:** cuasi-experimental

## **CRITERIOS DE SELECCIÓN**

### **Criterios de inclusión**

- a) Pacientes con diagnóstico de infección de VIH. (criterios del CDC 1994).<sup>(30)</sup>
- b) Pacientes menores de 16 años.
- c) Pacientes mayores de 1 año.

### **Criterios de no-inclusión**

a) Exposición a pacientes con cuadro de hepatitis A, dos a seis semanas antes de la vacunación.

- b) Antecedente de vacunación para Hepatitis A.

### **Criterios de exclusión**

- a) Retiro voluntario del estudio.
- b) Presencia de anticuerpos contra- VHA al inicio del estudio.

## DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

### OBJETIVO 1

Variables	Tipo de variable	Escala de medición	Definición operacional
<b>Variable Independiente:</b> Esquema de vacunación con vacuna inactivada de Hepatitis A	Cualitativa Modalidades: a) Completo b) Incompleto	Nominal	1ª dosis 0.5 mL intramuscular región deltoidea. A los seis meses 2ª dosis 0.5 mL intramuscular en región deltoidea
<b>Variable dependiente:</b> Porcentaje de seroprotección	Cuantitativa	Continua	Porcentaje de niños con concentración de anticuerpos contra-VHA > 20 mIU/ml

### OBJETIVO 2

Variables	Tipo de variable	Escala de medición	Definición operacional
Variable Independiente: Esquema de vacunación con vacuna inactivada de Hepatitis A	Cualitativa Modalidades: a) Completo b) Incompleto	Nominal	1ª dosis 0.5 mL intramuscular región deltoidea. A los seis meses 2ª dosis 0.5 mL intramuscular en región deltoidea
Variable dependiente: Porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan CD25 y CD69	Cuantitativa	Continua	Porcentaje de linfocitos CD4+, que expresan las moléculas de activación linfocitaria (CD25 y CD69) en respuesta al estímulo del antígeno vacunal

### OBJETIVO 3

Variables	Tipo de variable	Escala de medición	Definición operacional
Variable Independiente: Categoría inmunológica	Cuantitativa	Intervalo	Cifra de Linfocitos CD4+/µl
Variable dependiente: Títulos de anticuerpos	Cuantitativa	Continua	Títulos de anticuerpos contra-VHA

## DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

El presente trabajo se llevó a cabo en el Hospital de Pediatría de CMN SXXI, en el Servicio de Infectología y en los laboratorios de Virología e Inmunología.

Se incluyeron en el estudio pacientes con diagnóstico de VIH, edades entre 1 a 16 años, sin antecedente de haber recibido la vacuna de Hepatitis A.

Los pacientes fueron captados en la clínica de VIH/SIDA del Servicio de Infectología. Previo consentimiento informado al padre o tutor, se tomó muestra sanguínea para identificación cualitativa de anticuerpos totales específicos contra-VHA (IMX ® HAVAB ABBOTT), a fin de descartar antecedente de infección por el virus. En los pacientes negativos para anticuerpos contra VHA, se cuantificó la subpoblación de linfocitos CD4+ y la carga viral para VIH-1 así como el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan las moléculas de activación linfocitaria CD25 y CD69 (tiempo cero). Anexo 4.

Inmediatamente después se aplicó la primer dosis de vacuna inactivada para Hepatitis A (VAQTA ®, MSD USA) en dosis de 0.5ml IM en región deltoidea, correspondientes a 720 Unidades ELISA y equivalentes a 25ng de proteína viral.

A las ocho semanas de la aplicación de la vacuna, se tomó muestra sanguínea para evaluar en forma cuantitativa títulos de anticuerpos específicos contra-VHA mediante el método de ELISA (ENZYGNOST ® ANTI-HAV de DADE BEHRING) y el porcentaje de linfocitos T CD4+, que expresan las moléculas de activación linfocitaria en respuesta al estímulo del antígeno vacunal *in vitro*.

A los seis meses (24 semanas) de la primera dosis de vacuna se aplicó el refuerzo de vacunación con 0.5ml IM (720 UE) de vacuna inactivada y seis semanas después, (32 semanas del inicio del esquema) se midieron anticuerpos totales contra-VHA, carga viral para VIH-1, linfocitos T CD4+ totales y el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan las moléculas de activación linfocitaria, estudiadas.

Para la medición de anticuerpos específicos contra VHA, se utilizó una curva construida utilizando las diluciones estándar de inmunoglobulinas séricas propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los títulos de anticuerpos fueron expresados en mIU/ml, los títulos  $>20$  mIU/ml fueron considerados como protectores.

## **ANÁLISIS DE DATOS**

1. Forma de captura: Hoja de recolección de datos (Anexo 1).
2. Descripción de Variables: Medidas de tendencia central y dispersión apropiadas a cada variable.
3. Pruebas estadísticas utilizadas:
  - a) Para la comparación de promedios se utilizó prueba de T para grupos relacionados (Pareados), con distribución normal, o su alternativa no paramétrica (Suma de rangos de Wilcoxon) si la variable dependiente tuvo distribución no normal.  
  
Se determino media geométrica para los títulos de anticuerpos (MGT).
  - b) Para calcular la correlación entre variables se empleó el coeficiente r de Spearman.
4. Paquete estadístico: SPSS ver 12.0.
5. Tablas de salida:

Variabes cualitativas nominales: tabla de distribución de frecuencias.

Variabes cuantitativas continuas: gráfico de correlación.

## **VII. FACTIBILIDAD Y ASPECTOS ETICOS**

El presente trabajo contó con aprobación del Comité local de Investigación del Hospital de Pediatría de CMN SXXI.

Se siguió lo establecido por la Declaración de Ginebra de la Asociación Médica Mundial y el Código Internacional de Ética Médica, (Apéndice A) así como de la ley General de Salud en materia de Investigación, según las directrices para investigación biomédica que involucra a sujetos humanos. Se solicitó consentimiento informado a cada padre o tutor, dónde se explicó detalladamente sobre el procedimiento, riesgos previsibles e incomodidades que pudieran presentarse. Se hizo del conocimiento de los padres o tutores los beneficios para el niño, recomendando llegar a final del estudio para que este recibiera las dos dosis de vacuna y se evaluará su respuesta a la misma.

Se mantuvo confidencialidad de los resultados, los cuáles fueron discutidos únicamente con el familiar y con su médico tratante. La administración de la vacuna se registró en cada Cartilla Nacional de Vacunación

## **VII. RECURSOS: HUMANOS, FISICOS Y FINANCIAMIENTO**

**Recursos humanos:** La toma de muestra, procesamiento de las mismas, aplicación de maniobra sobre el paciente y seguimiento de los mismos fueron realizados por un alumno de la maestría en Ciencias Médicas.

**Recursos físicos:** Se cuenta con los recursos físicos en los laboratorios de Virología e Inmunología del Hospital de Pediatría de CMN SXXI

**Financiamiento:** Se concursó por financiamiento del IMSS y se obtuvo a través del FOFOI, con el número IMSS 2004-122.

## IX. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

<b>Actividad</b>	<b>Fecha</b>
Delimitación del tema a estudiar	Noviembre 2002
Recuperación, revisión y selección de bibliografía	Noviembre a Diciembre 2002
Elaboración de protocolo	Enero a Marzo 2003
Solicitud de financiamiento	Abril 2004
Estandarización de técnica de laboratorio	Abril 2004
Recolección de información y realización operativa	Mayo-Diciembre 2004
Análisis de resultados	Enero 2005
Escritura de tesis	Enero– Febrero 2005

## RESULTADOS

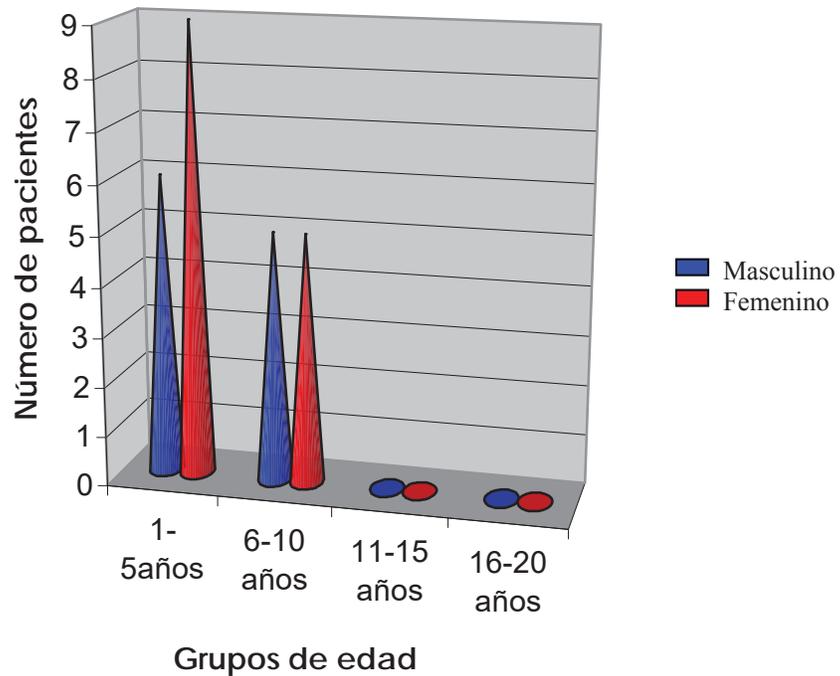
Se estudiaron 45 pacientes pediátricos infectados por VIH, excluyéndose 16 por tener anticuerpos IgG positivos para VHA, se perdieron cuatro durante el seguimiento quedando 25 pacientes para el estudio. La media de edad fue de 5.2 años (DS  $\pm$ 2.8) todos ellos infectados por vía perinatal. Todos los pacientes se encontraban recibiendo terapia antiretroviral altamente activa (HAART), El 56% de los pacientes requirió de cambio de esquema antirretroviral por falla a tratamiento en algún momento de su evolución, el 64% recibió combinación de Lopinavir-Ritonavir y dos inhibidores de transcritoasa reversa. Dos tenían falta de apego al manejo antiretroviral (Tabla 1)

**Tabla 1. Fármacos utilizados y porcentaje de pacientes que los recibieron al inicio del estudio**

<b>Fármacos</b>	<b>N (%)</b>
Zidovudina, Lamivudina, Ritonavir	8 (32)
Zidovudina, Didanosina, Ritonavir	1 (4)
Zidovudina, Lamivudina, Lopinavir/Ritonavir	5 (20)
Zidovudina, Didanosina, Lopinavir/Ritonavir	5(20)
Estavudina, Didanosina, Efavirens, Lopinavir/Ritonavir	1(4)
Nevirapina, Didanosina, Estavudina, Lopinavir/Ritonavir	1 (4)
Zidovudina, Lamivudina, Nevirapina, Lopinavir/Ritonavir	2 (8)
Zidovudina, Didanosina, Nevirapina, Saquinavir, Lopinavir/Ritonavir	2 (8)
<b>Total</b>	<b>25 (100)</b>

La distribución por género fue 56% (14/25) para el sexo femenino y 44% (11/25) para el sexo masculino. La distribución por grupo etario y género se muestra en la figura 1.

Figura 1.- Distribución por grupos de edad y sexo



En base a la cifra de linfocitos T CD4+ presentes al momento de la primera dosis de vacuna, se encontró que 56% (14/25) no tenían evidencia de inmunosupresión, 28% (7/25) tenían supresión moderada y en el 16% (4/25) mostró supresión severa. (Tabla 2)

**Tabla 2. Número de pacientes con títulos de anticuerpos protectores contra VHA por categoría inmunológica a las 8 y 32 semanas después del inicio de la inmunización**

<b>Categoría inmunológica</b>	<b>N</b>	<b>No (%)de pacientes con títulos protectores a las 8 semanas de la primera dosis</b>	<b>No (%) de pacientes con títulos protectores a las 32 semanas de la primera dosis</b>
<b>Sin supresión</b>	14	13/14 (92.8%)	14/14 (100%)
<b>Supresión moderada</b>	7	6/7 (85%)	7/7 (100%)
<b>Supresión severa</b>	4	1/4 (25%)	3/4 (75%)
<b>Total</b>	25	20/25 (80%)	24/25 (96%)

T de student para muestras relacionadas:  $p < 0.05$

El promedio de linfocitos T CD4+ al momento de la administración de la primer dosis de vacuna fue de 1,162 cel/ $\mu$ l (DS  $\pm$  782) y en el momento de la segunda dosis fue de 1,033 (DS  $\pm$  651) no se encontró diferencia significativa entre ambos momentos. ( $p < 0.05$ )

### **Inmunogenicidad**

Luego de la primera dosis de vacuna, el 84% (20/25) de los pacientes alcanzaron títulos de anticuerpos a títulos protectores ( $>20$  mIU/ml) y a las 32 semanas el 96% (24/25) alcanzó dichos títulos. Al finalizar el esquema de vacunación el 100% de los pacientes sin supresión y con supresión moderada tuvieron producción alguna de anticuerpos a títulos seroprotectores mientras que el grupo con supresión severa solo lo logró el 75% de los pacientes. (Tabla 2)

Tres pacientes, uno de cada grupo, no tuvieron producción de anticuerpos posterior a la primera dosis, sin embargo al final del esquema los pacientes del grupo sin supresión y con supresión moderada alcanzaron títulos a niveles protectores, no así el paciente del grupo de supresión severa.

La MGT contra VHA fue de 55 mlU/ml y 75 mlU/ml respectivamente a las 8 y 32 semanas, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambas determinaciones ( $p < 0.05$ ). (Fig. 2) La MGT por categoría inmunológica y momento de inmunización se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3. Media geométrica de títulos de anticuerpos contra VHA por categoría inmunológica a las 8 y 32 semanas después del inicio de la inmunización específica**

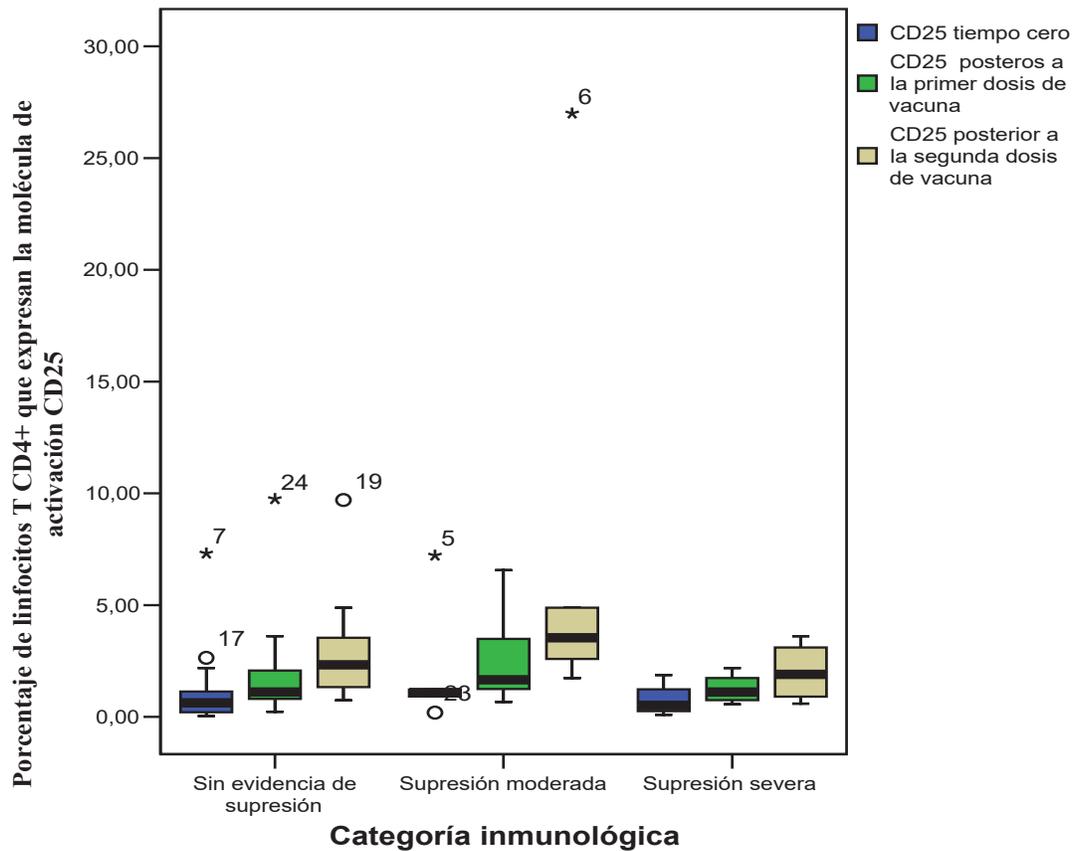
Categoría inmunológica	Media geométrica (mlU/ml) a las 8 semanas de la primera dosis	Media geométrica (mlU/ml) a las 32 semanas de la primera dosis.
<b>Sin supresión</b>	68.9	78.0
<b>Supresión moderada</b>	58.4	87.5
<b>Supresión severa</b>	18.9	48.0
<b>Total</b>	146.2	213.5

T de student para muestras relacionadas:  $p < 0.05$

### **Inmunidad celular**

La media del porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresaron la molécula de activación linfocitaria CD25 en el tiempo cero fue de 1.30 (DS  $\pm 4.7$ ), posterior a la primera y segunda dosis de vacuna esta fue de 1.99 (DS  $\pm 5.5$ ) y 3.7 (DS  $\pm 6.9$ ) respectivamente. Este incremento en el porcentaje de linfocitos que expresan esta molécula de activación es significativo desde la primera dosis de vacuna en relación al porcentaje expresado en el tiempo cero ( $p < 0.05$ ). (Fig. 2)

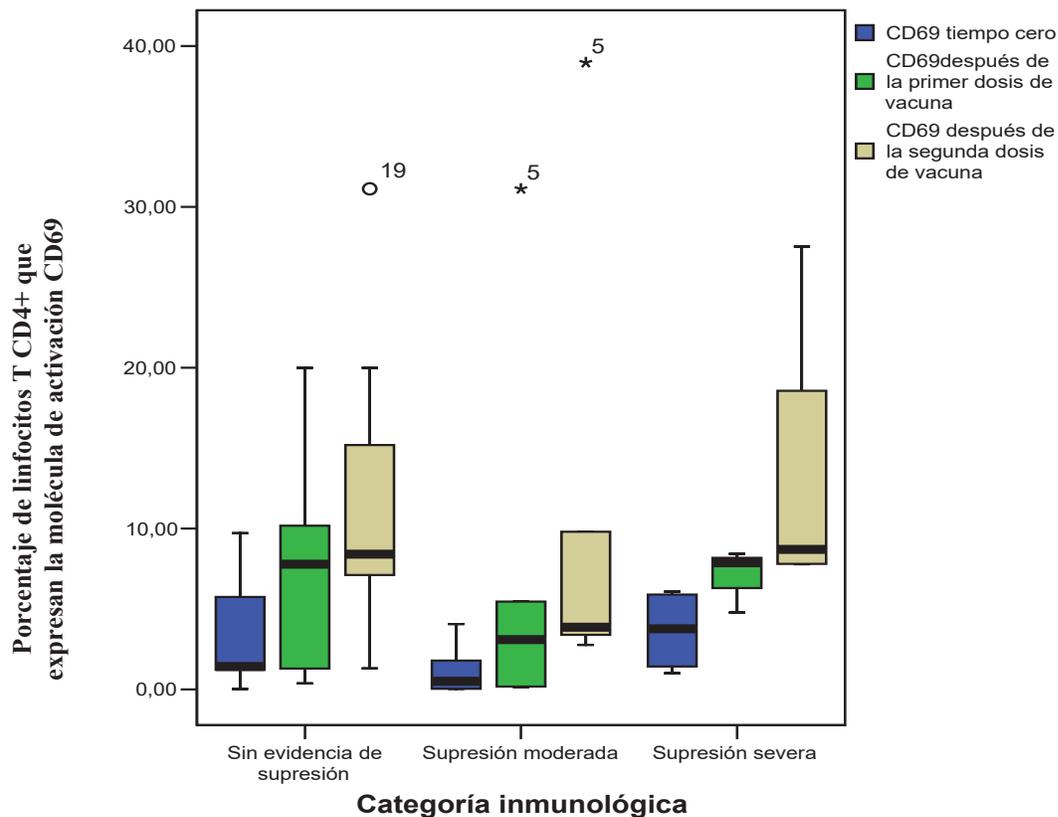
**Fig. 2** Porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan la molécula de activación CD25 por categoría inmunológica en las mediciones basal y después de la primera y segunda dosis de vacuna inactivada de Hepatitis A



\* Prueba de los rangos de Wilcoxon, entre tiempo cero y primera dosis, así como tiempo cero y segunda dosis  $p < 0.05$ .

Por otra parte el porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresaron la molécula de activación linfocitaria CD69 en el tiempo cero, fue de 2.6 (DS ± 2.6) y después de la primera y segunda dosis fue de 7.4 (DS ± 8.2) y de 11.1 (DS ± 3.4) respectivamente. El incremento es también significativo a partir de la primer dosis de vacuna (p: <0.05) (Fig.3)

**Fig. 3. Porcentaje de linfocitos T CD4+ que expresan la molécula de activación CD69 por categoría inmunológica en las mediciones basal y después de la primer y segunda dosis de Vacuna inactivada de Hepatitis A**



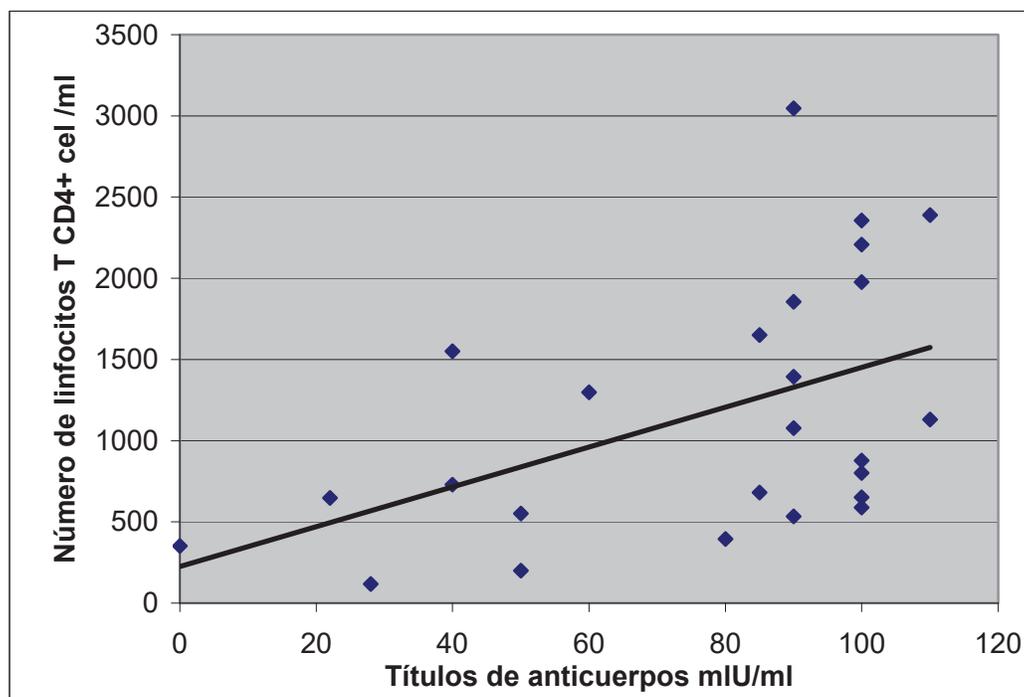
\* Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon: p<0.05 entre tiempo cero y primera dosis, así como tiempo cero y segunda dosis.

\*\* Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon: p NS comparando los tres momentos del grupo de supresión severa con los grupos de supresión moderada y sin supresión

Cuando se hizo el análisis por categoría inmunológica se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos que expresaron estas moléculas de activación en los tres tiempos analizados dentro de cada categoría, sin embargo no existieron diferencias en cada uno de los tiempos analizados entre los tres grupos de categoría inmunológica. (Fig. 2 y 3)

Al relacionar el número absoluto de linfocitos CD4+ y el título de anti-VHA se encontró una correlación significativa ( $p=0.007$ ). (Fig. 4).

**Fig. 4 Correlación entre número de Linfocitos T CD4+ y el títulos de anticuerpos al final del esquema de inmunización**



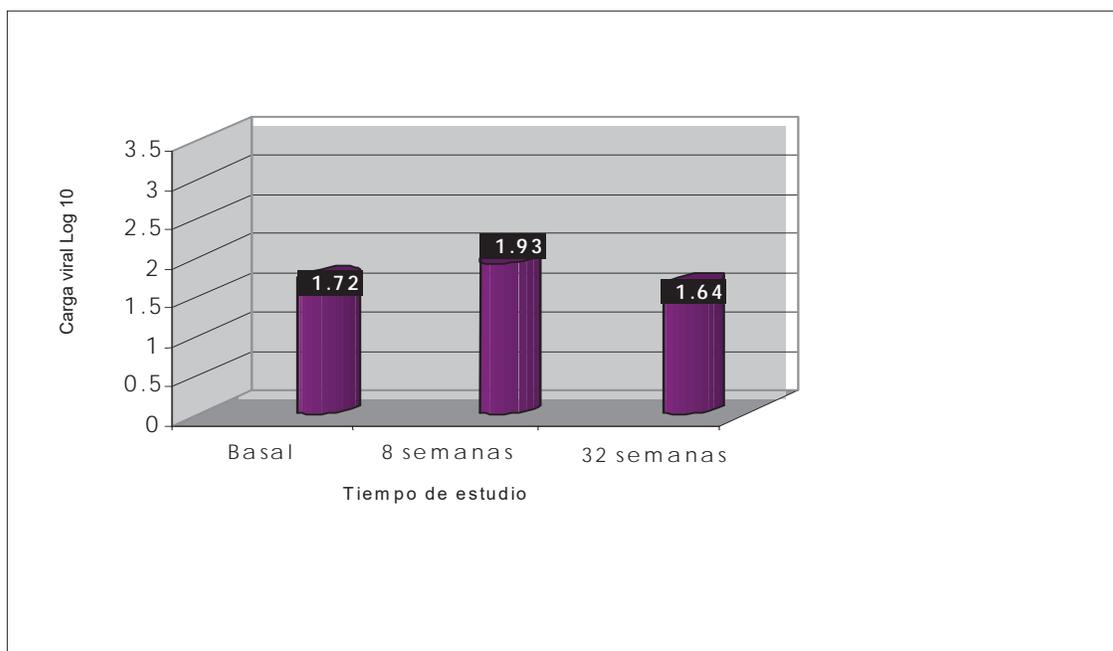
Rho de Spearman: ( $p=0.007$ )

## Seguridad.

Se encontraron eventos adversos relacionados a la vacunación en tres pacientes luego de haberseles aplicado a la primera dosis de vacuna. Dos de ellos presentaron fiebre (8%) y un paciente tuvo dolor importante en el sitio de aplicación de la vacuna hasta 24hrs después de su administración (4%). Después a la segunda aplicación no existieron efectos adversos.

En la determinación de carga viral (CV) ocho semanas después de la administración de cada dosis de vacuna (8 y 32 semanas) no se encontró incremento estadísticamente significativo. Las medianas de la CV son las siguientes: Tiempo cero de 1.72 log/10 a las 8 semanas de 1.93 log/10 y a las 32 semanas de 1.64 log/10 (Fig. 5)

**Fig. 5 Medición de la Carga viral VIH-1 basal y a las 8 y 32 semanas**



Wilcoxon: p: NS

Medianas de Carga viral en lóg/10 del número de copias de RNA de VIH/ml

## **DISCUSION**

Los niños infectados por VIH son particularmente vulnerables a enfermedades causadas por patógenos prevenibles por vacunación y aunque la inmunización de rutina es generalmente segura para el paciente infectado por VIH, la respuesta en algunos casos es subóptima, pues intervienen varios factores en el desarrollo de una adecuada respuesta de memoria. <sup>(38,50)</sup>

### **Inmunogenicidad**

El conocimiento en el desarrollo y la longevidad de anticuerpos en sujetos infectados por VIH son poco claros. En uno de los primeros estudios realizados en este tipo de pacientes, Hess en 1995 encontró en adultos infectados que la respuesta y el nivel de anticuerpos es menor que el alcanzado por sujetos no infectados, <sup>(47)</sup> posteriormente Bodsworth evaluó la seguridad de la vacuna y comparó la respuesta en adultos con y sin infección por VIH, concluyendo que la vacuna es segura y que estos pacientes deben ser vacunados a pesar de una cifra disminuida de linfocitos CD4+, sin embargo no describió la respuesta al estímulo vacunal en relación al número de linfocitos T CD4+. <sup>(48)</sup> En el año 2004 Wallace reportó que en adultos infectados las tasas de seroconversión variaban entre el 40% al 88% después de dos dosis de vacuna, <sup>(51,52,53)</sup> mientras que Kemper en un estudio multicéntrico encontró que después de concluir el esquema encontró una seroconversión del 68% en pacientes con cuentas  $\geq 200 \text{ cel/mm}^3$  y solo del 9% en aquellos con cuentas  $\leq 200 \text{ cel/mm}^3$ . <sup>(40)</sup> En nuestro trabajo confirmamos que esta capacidad de respuesta a la vacuna se hace evidente en el grupo de pacientes sin supresión y con supresión inmunológica moderada ya que posterior a la segunda dosis el 100% de los pacientes alcanzan títulos de anticuerpos incluso muy por encima del nivel de seroprotección, este comportamiento es similar al reportado en

pacientes pediátricos sanos. Por otra parte, si bien el número de sujetos en el grupo de supresión severa fue escaso, estos tuvieron un comportamiento como el descrito en adultos con enfermedad avanzada, <sup>(50)</sup> logrando solo las dos terceras partes de los individuos, títulos seroprotectores al final del esquema.

En pacientes infectados por VIH-1 la inmunidad humoral y celular se ven alteradas, ya que el virus destruye y altera la función de las células presentadoras de antígenos y de la subpoblación de linfocitos T CD4+ que proveen ayuda a las células B y T. <sup>(50)</sup> Por tanto el nivel de respuesta esperado está relacionado con el grado de inmunosupresión, o más específicamente con el número absoluto o porcentaje de linfocitos T CD4+. La relación entre la concentración de anticuerpos y el número absoluto de CD4+ obtenida en este estudio fue significativa, de tal forma que la media geométrica de anticuerpos aumenta en relación a la cifra de linfocitos T CD4+ siendo incluso evidente en el grupo de supresión severa dónde la cifra seroprotectora es menor en la primera dosis, sin embargo se duplica al final del esquema. Este nivel de correlación puede explicarse entre otros fenómenos por el nivel de compromiso de la cooperación entre las células B y T, necesario para mantener un estado inmunológico apropiado.

### **Respuesta inmune celular**

Existen pocos estudios que evalúen la respuesta inmune celular en respuesta a la vacuna de hepatitis A en huéspedes inmunocompetentes, sin embargo se sabe que ésta se encuentra presente en la enfermedad natural e interviene en la respuesta de memoria, <sup>(50)</sup> lo que cobra especial interés en sujetos infectados por VIH

Hasta el momento la evaluación de la respuesta inmune celular a un inmunógeno en forma controlada utilizando un estímulo vacunal, no es un procedimiento estandarizado. Uno de

los métodos más utilizados es determinar la incorporación de timidita tritiada al medio en el cual se encuentran células mononucleares expuestas al antígeno objeto de evaluación, sin embargo el uso de radioisótopos tiende a abandonarse por los riesgos que acarrea. Se conoce que una vez en presencia de un antígeno, los linfocitos cooperadores se activan, induciendo la expresión de algunos marcadores de activación linfocitaria como CD25 y CD69, los cuales pueden ser detectados mediante anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína.<sup>(54)</sup> La evaluación de la respuesta inmune celular en nuestros pacientes mostró un incremento en el porcentaje de linfocitos activados en forma significativa  $p < 0.05$  posterior a la primera dosis de vacuna en relación a la expresión basal así como a la segunda dosis en forma independiente del grado de inmunosupresión. El porcentaje de linfocitos que expresan CD69 posterior a la segunda dosis en los pacientes con inmunosupresión severa, fue mayor que el presentado en los otros dos grupos, si bien esta diferencia no fue estadísticamente significativa, una de las posibles explicaciones a este fenómeno es una mayor capacidad de activación ante un estímulo antigénico o a una potenciación de su actividad efectora en compensación a un reducido número de células CD4+. Estas hipótesis requieren de evaluación con estudios futuros.

Varios trabajos han documentado aumento transitorio en la concentración de carga viral, posterior a la inmunización de niños y adultos infectados por VIH-1, sin embargo, se ha descrito que esta vuelve a la cuenta basal en 6-8 semanas, poco se sabe acerca de los efectos a largo plazo de estos episodios repetidos de viremia transitoria.<sup>(51)</sup> En nuestro estudio no encontramos diferencias significativas entre la carga viral al momento basal y después de cada dosis de vacuna. La modificación de la carga viral parece ser un fenómeno transitorio que probablemente es contenido por el sistema inmune aún a pesar de que exista

deterioro inmunológico en el paciente y no parece estar directamente relacionado con el estímulo vacunal en este caso en particular a una vacuna inactivada.

La aplicación de la vacuna inactivada contra Hepatitis A tiene como objetivo el reducir el número de sujetos que presentan complicaciones como: hepatitis fulminante, hepatitis persistente y recaídas por hepatitis A, las cuales se presentan frecuentemente en coinfección con el virus del VIH. Si consideramos los cambios en el comportamiento de la infección por VHA en nuestro país, así como el incremento en el número de sujetos susceptibles se hace necesario el establecimiento de estrategias de inmunización contra hepatitis A, principalmente en niños. En nuestro estudio, la cifra de niños infectados susceptibles a VHA fue del 66%, muy superior a lo reportado previamente en niños sanos Mexicanos<sup>(4, 5, 6, 7, 8)</sup> y similar a datos publicados en adultos infectados por VIH en países de baja prevalencia de hepatitis A,<sup>(46)</sup> por lo tanto debe establecerse un programa permanente de inmunización contra VHA, dado que la inmunogenicidad y la tolerabilidad de la vacuna fueron adecuadas, esta conducta principalmente dirigida para los grupos sin supresión y con supresión moderada en quienes la respuesta es muy buena, sin embargo para los pacientes del grupo de supresión severa deberá ser considerada la administración de una tercera dosis de vacuna para lograr la seroprotección en la mayor parte de los pacientes al final del esquema. De tal forma que es conveniente realizar nuevos estudios para conocer la utilidad de una dosis adicional en el grupo con inmunosupresión severa, de igual forma recomendamos evaluar si el esperar a la reconstitución del sistema inmune con terapia antiretroviral puede ser de utilidad para mejorar la respuesta a la vacuna, dado que está descrito que no necesariamente esta reconstitución incluye la restauración de la función de memoria. En este trabajo de los tres pacientes que inicialmente no tuvieron producción de

anticuerpos a la primera dosis de vacuna, dos desarrollaron anticuerpos a títulos protectores al final del esquema, sin embargo pertenecían a los grupos sin supresión o con supresión moderada respectivamente. Un tercer paciente con supresión severa que a la segunda dosis había incrementado sus cifras de CD4+ y que se incluyó en el grupo de supresión moderada no presentó respuesta alguna a ninguna de las dos dosis. Por tanto la probabilidad que existan pacientes que se comporten como no respondedores está presente en este último grupo de pacientes.

Este es el primer trabajo realizado en población pediátrica infectada por VIH-1 y nos lleva a la conclusión de que la vacuna inactivada contra VHA es altamente inmunogénica y bien tolerada en este grupo de pacientes, sin embargo se logra una mejor respuesta si el porcentaje de linfocitos T CD4+ se encuentra por encima del 14% de la cuenta en el momento de iniciar la inmunización.

## **Conclusiones**

1. En el grupo de pacientes sin evidencia de supresión la respuesta inmune humoral es semejante a la presentada por niños sanos.
2. La respuesta inmune celular es significativa desde la primera dosis de vacuna y se encuentra presente en forma significativa en los tres grupos de categoría inmunológica.
3. Se recomienda la vacunación en pacientes sin evidencia de supresión inmunológica y con supresión moderada
4. El esquema convencional de dos dosis de vacuna inactivada de Hepatitis A es suficiente para lograr seroprotección en el 96% de los pacientes pediátricos infectados.
5. Es importante realizar estudios sobre la respuesta a la administración de una dosis adicional al esquema tradicional de vacunación en el grupo de supresión severa.
6. De igual manera evaluar si la reconstitución del sistema inmune con tratamiento antiretroviral es de utilidad para mejorar la respuesta antigénica.
7. La aplicación de vacuna de Hepatitis A en niños con VIH/SIDA es bien tolerada y no tiene efectos en la carga viral de VIH-1.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Yang NY, Yu PH, Mao ZX, Chen NL, Chai SA, Mao JS. Inapparent Infection of Hepatitis A virus. *American J of Epidemiology*. 1988; 127:599-604.
2. Ciocca M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine*. 2000; 18:S71-S74.
3. Silvestri AD, Avanzini MA, Terulla V, Zucca S, Pollati F, Belloni C. Decline of maternal Hepatitis A virus antibody levels in infants. *Acta Paediatr*. 2002; 91: 882-884.
4. Bustamante C, Correa B, Alvarez y Muñoz MT, Ruíz GJ, Muñoz HO. Etiología de la hepatitis en la Ciudad de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1986; 43:5-10.
5. Bustamante C, Velásquez C, Padilla N, Alvarez y Muñoz MT, Moreno AL, Martínez GM. Seroepidemiología de la infección por el virus A de la hepatitis en comunidades de la frontera sur del estado de Chiapas. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1986; 43:735-741.
6. Calderón JE. Nuevos horizontes en el diagnóstico y prevención de la hepatitis viral. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 1986; 43:731-734.
7. Kumate J, Alvizouri A, Isibasi A. Encuesta Serológica de Hepatitis A en niños de México. *Bol of Sanit Panam*. 1982; 92:494-498.
8. Bustamante CM, Ruíz G. Hepatitis A. Frecuencia de niños de cero a cinco años de edad. *Gac Med Mex*. 1983; 119:77-81.
9. Tanaka J. Hepatitis A shifting epidemiology in Latin America. *Vaccine*. 2000; 18 suppl 1:S57-60.
10. Tapia CR, Santos JI, Cavalcanti AM, Urdaneta E, Rivera L, Manterola A, et al. Hepatitis A in Latin America: a changing epidemiologic pattern. *AMJ Trop Med Hyg*. 1999; 61:825-9.
11. Kanra G, Yalcin SS, Kara A, Ozmert E, Yurdakok K. Hepatitis A booster vaccine in children after infant immunization. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; 21:727-30.
12. Kwon J. Hepatitis A and HIV: a Clinical review of Disease and Strategies for prevention. *JANAC*. 1999; 10 (2): 31-36.
13. Innis JB, Snitbhan R, Kunasol P, Laorakpongse T, Poopatanakool W, Chirstine AK et al. Protection against Hepatitis A by an inactivated vaccine. *JAMA*. 1994; 271(17): 1328-1334.

14. Connor BA, Phair J, Sack D, McEniry D, Hornick R, Banerjee D. Randomized, Double-Blind Study in Healthy Adults to Assess the Boosting Effect of Vaqta or Havrix after a Single Dose of Havrix. *Clin Inf Dis.* 2001; 32: 396-401.
15. Scheifele DW, Ochnio J. Hepatitis A vaccine: Is it being used to best advantage?. *CMAJ.* 2002; 167 (1): 102-107.
16. Werzberg A, Kuter B, Nalin D. Six Year's Follow-up after Hepatitis A Vaccination. *N Eng J Med.* 1998; 16:1160.
17. López L E, Xifro M, Torrado L. Safety and Immunogenicity of a pediatric formulation of inactivated hepatitis A vaccine in Argentinean children. *Pediatr Infect Dis. J* 2001; 20:48-52.
18. Anonymous. Recommended Childhood Immunization Schedule United States 1999. *MMWR*; 48 (RR-12): 1-37.
19. Krause DS. Hepatitis A vaccines. *JAMA.* 1996; 276:449-450.
20. Gardner P, Pickering LK, Orenstein WA, Gershon AA, Nichol KL. Guidelines for Quality Standards for Immunization. *Clin Inf Dis.* 2002; 35: 503-511.
21. Murray P R, Kobayashi SG, Pfaller M. *Medical Microbiology* 1997; 2a Ed: 153-158.
22. Castro GS. Occurrence of Acute Hepatitis A in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Clin Inf Dis.* 2001; 33:1613.
23. Lusarck J. Who needs vaccination against hepatitis viruses?. *Vaccine.* 2000; 18:S4-S5.
24. Comité Asesor de las prácticas de inmunización, Academia Americana de Pediatría. Esquema de Inmunización recomendado para la infancia y la adolescencia ACIP. *MMWR.* 2003;52:4.
25. Demicheli V, Tiberi D. The effectiveness and safety of hepatitis A vaccine: a systematic review. *Vaccine.* 2003; 21:2242-2245.
26. Franco E, Giambi C, Ialacci R, Coppola RC, Zanetti AR. Risk groups for hepatitis A virus infection. *Vaccine.* 2003;21:2224-2223.
27. Borkowsky W, Rigaud M, Krasinsky K, Moore T, Lawrence R, Pollack H. Cell-mediated and humoral immune responses in children infected with human immunodeficiency virus during the first four years of life. *J pediatr.* 1992; 120; 371-375.

28. Boyer J, Ugen K, Wang B, Chattergoon M, Tsai A, Merva M, Weiner DB. Induction of a TH1 type cellular immune response to the human immunodeficiency type 1 virus by in vivo DNA inoculation. *Developments in Biological Standardization*. 1998; 92: 169-74.
29. Gherardi MM, Ramirez JC, Esteban M. Towards a new generation of vaccines: the cytokine IL-12 as an adjuvant to enhance cellular immune response to pathogens during prime-booster vaccination regimen. *Histology & Histopathology*. 2001; 16(2): 655-67.
30. Burchett KS, Pizzo PA. HIV Infection in Infants, Children, and Adolescents. *Pediatrics in Review*. 2003; 24:186-194.
31. Ida S, Tachikawa N, Nakajima A, Daikoku M, Yano M, Kikuchi Y, et al. Influence of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection on Acute Hepatitis A Virus Infection. *Clin Inf Dis*. 2002; 34: 379-385.
32. Mattioli CM, Allavena C, Poirier CA, Billaudel S, Raffi F, Ferre V. Prolonged Hepatitis A Infection in a seropositive patient. *J Med Virol*. 2002; 68(1): 7-11.
33. Fonqueniére L, Meyand A, Charois C, Delamare M, Meyohans, Frottier J. Occurrence of Acute Hepatitis A in Patients Infected with Human Immunodeficiency Virus. *CID*. 2001; 32: 297-9.
34. Moss WJ, Clements J, Halsey NA. Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Bulletin of the World Health Organization*. 2003;81:61-70.
35. Taliani G, Battista G. Hepatitis A: post-exposure prophylaxis. *Vaccine*. 2003; 21:2234-2237.
36. Farber CM, Barath A, Dieye T. The effects of Immunization in Human immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *N Engl J Med*. 1996; 335:817.
37. Moss RB, Wallace MR, Steigbigel R, Morrison SA, Giermakowska WK, Nardo CJ, Diveley. Predictors of HIV-Specific lymphocyte proliferative immune responses induced by therapeutic vaccination. *Clin Exp Immunol*. 2002; 128:359-364.
38. McFarland E. Immunizations for the Immunocompromised Child. *Pediatric Annals*. 1999; 28 (8): 487-496.
39. Koff SR. Hepatitis A. *Lancet*. 1998; 341:1643-49.

40. Kemper AC, Haubrich R, Frank I, Dubin G, Buscarino C, McCutchan MA. et. al. Safety and Immunogenicity of Hepatitis A Vaccine in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients: A Double-Blind, Randomized Placebo-Controlled Trial. *J of Infectious Diseases*. 2003; 186:1327-31.
41. Tilzey AJ, Palmer SJ, Harrington C, O'Doherty MJ. Hepatitis A vaccine responses in HIV-positive persons with haemophilia. *Vaccine*. 1996; 14 (11): 1039-1041.
42. Flehming B, Staedele H, Xueref C. Early appearance of neutralizing Antibodies after Vaccination with an Inactivated Hepatitis A vaccine. *Journal of Infection*. 1997; 35:37-40.
43. Lemon S, Binn L. Serum Neutralizing Antibody response to Hepatitis A Virus. *J Infect Dis*. 1983; 148:1033-1039.
44. González G, Guerrero F, Rodríguez MAI. Vaccinations in the HIV infected patient. *Rev Clin ESP*. 2000; 200 (11): 619-621.
45. Cederna JB, Klinzman D, Stapleton JT. Hepatitis A virus-specific humoral and cellular immune responses following immunization with a formalin-inactivated hepatitis A vaccine. *Vaccine*. 2000; 18:892-898.
46. Setsuko I, Tachikawa N, Kikuchi Y, Yasuoka A, Schincihi O. Rate of Subclinical Hepatitis A virus Infection in Adult HIV-1 Infected patients. *Jpn J. Infected Dis*; 2001; 54:31-32.
47. Hess G, Clemens R, Bienzle U, Schonfeld C, Schunck B, Bock HL. Immunogenicity and safety of an inactivated hepatitis A vaccine in anti-HIV positive and negative homosexual men. *J of Medical Virology*. 1995; 46:40-2.
48. Bodsworth NJ, Neilsen GA, Donovan B. The effect of immunization with inactivated hepatitis A. Vaccine on the clinical course of HIV infection: 1-year of follow-up AIDS. 1997; 11:747-9.
49. Santagostino E, Gringeri A, Rocino A, Zanetti A, De Biasi R, Mannucci PM. Patterns of immunogenicity of an inactivated hepatitis A vaccine in anti-HIV positive and negative hemophilic patients. *Thrombosis & Hemostasis*. 1994; 72 (4): 508-10.
50. Nielsen AG, Bodsworth NJ, Watts N. Response to Hepatitis A Vaccination in Human Immunodeficiency Virus Infected and Uninfected Homosexual Men. *JID*. 1997; 176:1064-1067.
51. Obaro SK, Pugatch D, Luzuriaga K. Immunogenicity and efficacy of childhood vaccines in HIV-1 infected children. *Lancet Infect Dis*. 2004; 4:510-18.

52. Wallace MR, Brandt CJ, Earhart C, Kuter JB, Grosso DA, Lakkis H, Tasker as. Safety and Immunogenicity of inactivated Hepatitis A Vaccine among HIV-Infected Subjects. *CID*. 2004; 38:1207-1213.
53. Shire JN, Welge JA, Sherman KE. Efficacy of inactivated hepatitis A vaccine in HIV-infected patients: a hierarchical Bayesian meta-analysis. *Vaccine*. 2005; 55:1-8.
54. Ramilo O, Hicks JP, Borvak J, Gross ML, Zhong D, Squires EJ, Vitetta S. T cell activation and human immunodeficiency virus replication after influenza immunization of infected children. *Pediatr Infect Dis. J* 1996; 15:197-203.

Anexo 1

**Hoja de recolección de datos**

Folio: \_\_\_\_\_ Fecha de ingreso al estudio: \_\_\_\_\_ Procedencia: \_\_\_\_\_  
 Nombre: \_\_\_\_\_  
 Número de afiliación: \_\_\_\_\_ Domicilio: \_\_\_\_\_  
 Teléfono: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_\_ Diagnóstico: \_\_\_\_\_  
 Peso \_\_\_\_\_ Talla: \_\_\_\_\_

**Antecedentes:**

1. - Antecedente de Hepatitis SÍ: \_\_\_\_\_ NO: \_\_\_\_\_
2. - Antecedente de contacto con paciente con sospecha de hepatitis A hace cuatro semanas.  
 SÍ \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_

Esquema de inmunizaciones: **Número de dosis:** BCG ( ) SABIN ( ) DPT ( ) PENTAVALENTE ( ) TRIPLE VIRAL ( ) OTRAS: \_\_\_\_\_

3. - Efectos secundarios a administración de vacunas. SÍ \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
 Cuales: \_\_\_\_\_

Fecha	Carga viral VIH-1		CD4+		CD8+		Relación CD4/CD8
	Copias /ml	Log/10	Células/ $\mu$ l	%	Células/ $\mu$ l	%	
Basal							
6 meses							

BHC: Fecha: \_\_\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

	Fecha	CD25	CD69	Anticuerpos contra VHA mUI/ml
Tiempo cero				
ocho semanas				
28 semanas				

**Tratamiento antiretroviral: Al inicio:** \_\_\_\_\_  
**Cambios de tratamiento SI:** \_\_\_\_\_ **NO:** \_\_\_\_\_ **Cuáles:** \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

Efectos adversos		Primera dosis			Segunda dosis		
		Si	No	Duración	Si	No	Duración
<b>Locales</b>	Dolor <12 horas						
	Dolor > 12 horas						
	Eritema						
	Edema/induración						
	Hematoma						
<b>Sistémicas</b>	Anafilaxia						
	Náusea/vómito						
	Llanto prolongado						
	Fiebre						
<b>Otros</b>							

Fecha de aplicación de la vacuna: 1ª dosis: \_\_\_\_\_ 2ª dosis: \_\_\_\_\_

ANEXO 2

**Consentimiento informado**

Título del proyecto: **“RESPUESTA INMUNE A LA VACUNA INACTIVADA DE HEPATITIS A EN NIÑOS INFECTADOS CON EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1”**

Investigadores: Dra. Ileri García Juárez.

Dr. José Guillermo Vázquez Rosales.

**Antecedentes:**

El virus de Hepatitis A es una de las causas más frecuentes de hepatitis viral en los niños. Se ha demostrado que la aplicación de la vacuna es segura en niños infectados por el VIH por lo que se recomienda su aplicación.

**PROCEDIMIENTO:** Si consiento participar sucederá lo siguiente:

1. Responderé a preguntas sobre la historia médica de mi hijo (a) que dura 15 minutos.
2. Se aplicarán dos dosis de vacuna para Hepatitis A intramuscular en el brazo con intervalo de 6 meses cada una.
3. Se extraerá sangre (5-10ml) aproximadamente del brazo con aguja, para estudios serológicos en una ocasión y posteriormente, a las cuatro semanas de cada aplicación de la vacuna. La punción duele unos segundos y en ocasiones se produce un hematoma (moretón) pero es poco frecuente.

*El beneficio para el niño es la prevención de hepatitis A mediante la administración de la vacuna. (El paciente infectado por VIH responde a la vacuna alrededor del 50% de los casos)*

**CONFIDENCIALIDAD:**

Los resultados de todas las pruebas se discutirán conmigo y se enviarán a mi médico tratante. Toda la información será confidencial y será usada solo para efectos de la investigación. Mi identidad será mantenida en la medida que la ley lo permita.

**DERECHO A REHUSAR O ABANDONAR EL ESTUDIO.**

Mi participación en el estudio es enteramente voluntaria y soy libre de rehusar a tomar parte o abandonarlo en cualquier momento, sin afectar mi atención médica futura.

La Dra. Ileri García Juárez y/o Dr. José Guillermo Vázquez Rosales, han discutido esta información y se han ofrecido a responder mis preguntas. Si tengo alguna duda, puedo ponerme en contacto con ellos directamente en el servicio de Infectología del Hospital de Pediatría del CMN SXXI.

**CONSENTIMIENTO.**

Consiento a que mi hijo participe en este estudio, he tenido la oportunidad de leerlo.

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_ Afiliación: \_\_\_\_\_

Nombre y firma de padre o tutor: Recibí información por escrito

FECHA: \_\_\_\_\_ Firma del médico \_\_\_\_\_

Testigo: \_\_\_\_\_

Testigo: \_\_\_\_\_

### Clasificación inmunológica en niños

Categoría inmunológica	< 12 meses		1-5 años		6-12 años		>12 años
	No/mm <sup>3</sup>	%	No/mm <sup>3</sup>	%	No/mm <sup>3</sup>	%	No/mm <sup>3</sup>
1. - Sin evidencia de supresión	1500	25	>1000	25	500	>25	>350
2. - Supresión moderada	750- 1499	15-24	500-999	15-24	200-499	15-24	200-350
3. - Supresión severa	<750	<15	<500	<15	<200	<15	<200

Pediatrics in Review 2003; 24:186-194 <sup>(30)</sup>

## Anexo 4

### **Descripción de técnicas de laboratorio**

#### **Detección de cualitativa de anticuerpos IgG contra VHA**

Para la detección cualitativa de anticuerpos IgG contra VHA, se utilizó el equipo comercial IMX ® HAVAB (ABBOTT). Es un ensayo inmunoenzimático de micropartículas (MEIA), donde estas micropartículas recubiertas de anticuerpos (de cabra) específicas contra IgG humana se utilizan para unir inmunológicamente a las partículas IgG de la muestra. Si hay anticuerpos IgG contra el VHA presentes en la muestra los antígenos del VHA se unen al complejo micropartícula-anticuerpo. Posteriormente el conjugado monoclonal anti. VHA con fosfatasa alcalina se dispensa sobre la matriz y se une al complejo micropartícula –anticuerpo antígeno. Una vez realizado el lavado para eliminar los materiales no unidos a las micropartículas, se añade el sustrato de 4-metilumbelilferilfosfato a la matriz y el producto fluorescente se mide en el sistema óptico MEIA.

Interpretación de resultados: El valor de la tasa de la muestra es proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG contra VHA presente en la muestra. Los valores de la tasa de la muestra se comparan con los obtenidos en el control positivo para obtener el valor índice. Las muestras con valor índice superior a 1 se consideran como reactivas, el valor índice menor a 1 se considera como no reactiva para los anticuerpos IgG contra VHA.

## **Detección cuantitativa de anticuerpos totales contra VHA**

Para la detección cuantitativa de anticuerpos totales contra VHA se utilizó el equipo comercial ENZYGNOST® ANTI-HAV de DADE BEHRING.

Este método permite una determinación cuantitativa (con curva de calibración) del contenido de anticuerpos contra VHA y su expresión en mIU/ml con relación a un estándar internacional propuesto por la OMS.

Es un test inmunoenzimático de acuerdo al principio de ensayo competitivo, donde los anticuerpos específicos contenido en la muestra y el anticuerpo monoclonal contra el VHA conjugado con peroxidasa compiten con el sitio de unión del antígeno-VHA, dependiendo de la concentración del anticuerpo específico en la muestra, se va a unir una mayor o menor cantidad del conjugado al antígeno. El inmunocomplejo aquí formado se une a los anticuerpos específicos de la superficie de la placa de micro titulación. Al eliminar los componentes no enlazados por medio de lavado se determina la actividad enzimática del conjugado. La intensidad del color es indirectamente proporcional a la concentración de anticuerpo existente en la muestra.

Para lograr la curva de calibración, se realizarán las siguientes diluciones:

80 mIU/ml Con el suero estándar de 80

40 mIU/ml: Dilución 1:2 (100 µl de suero estándar 80 + 100 µl del suero control anti VHA negativo)

20 mIU/ml: Dilución 1:4 (100 µl de suero estándar 40 + 100 µl del suero control anti VHA negativo)

10 mIU/ml: Dilución 1:8 (100 µl de suero estándar 20 + 100 µl del suero control anti VHA negativo)

**Interpretación de resultados:** Para la determinación cuantitativa se determinaron los valores promedios para la determinación del estándar de la serie de estándar 10, 20,40,80 con la realización de una curva de referencia.

#### **Cuantificación de linfocitos T CD4+**

La sangre de los pacientes fue diluida en PBS (regulador de fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.4) en una relación de 1:3, se adicionó 4 ml de Lymphoprep con un gradiente de densidad de  $1.077 \pm 0.001$ gr/ml (Nycomed, Norway) por cada 7 ml de sangre diluida, se centrifuga a 2000 rpm por 30 min. Las células mononucleares se colectaron de la interfase, y se lavaron dos veces con PBS. La viabilidad celular fue determinada por exclusión de azul tripan (Bio Whittaker, USA).

Para la identificación de los linfocitos CD4+, se agregarán 500  $\mu$ l de la suspensión de células mononucleares ( $5 \times 10^5$  células/pozo). Se cosecharon y lavaron con PBS-BSA-Az (PBS pH 7.2, BSA 0.2 %,  $\text{Na}_3\text{N}$  0.2 %). Fueron incubadas con los anticuerpos (anti-CD4-FITC y anti-CD4-PE 1:10 [BD, PharMingen, USA]). La incubaciones se realizaron a 6°C durante 20 min., entre cada incubación las células se lavaron dos veces con PBS-BSA-Azida y fueron leídas por citometría de Flujo (FACSCalibur, Beckton & Dickinson, USA.) y analizadas con el programa Cell Quest.

#### **Determinación de las moléculas de activación linfocitaria**

##### **Separación de células:**

La sangre proveniente de los pacientes fue diluida en PBS (regulador de fosfatos 0.01M, NaCl 0.15M, pH 7.4) en una relación de 1:3, adicionada de 4 ml de Lymphoprep (Nycomed, Norway) con un gradiente de densidad de  $1.077 \pm 0.001$ g/ml por cada 7 ml de

sangre diluida, y se centrifugó a 2000 rpm por 30 min. Las células mononucleares se colectaron de la interfase, fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en medio AIMV (Gibco BRL, USA) (2mM L-glutamina 50 IU/ml penicilina y 50 µg/ml estreptomicina (Gibco BRL, USA). La viabilidad celular se determinó por captación de azul tripan (Bio Whittaker, USA).

**Ensayo *in vitro* de las moléculas de activación linfocitaria (CD25, CD69):**

Las células mononucleares se incubaron en placas de cultivo (Nunc, Denmark) de 96 pozos. A cada pozo y por duplicado se agregaron 500 µl de la suspensión de células mononucleares ( $5 \times 10^5$  células/pozo), fueron incubadas a 37°C y con 5% de CO<sub>2</sub> durante cuatro horas en las siguientes condiciones: a) (control negativo), únicamente medio de crecimiento b) mitógeno como control positivo (Concanavalina A 2 µg/ml) c) únicamente medio de crecimiento, d) Vacuna de hepatitis A con una dilución de 1:32 para CD25 y 1:4 para CD69. Al término de la incubación las células mononucleares se cosecharon y lavaron con PBS-BSA-azida (PBS pH 7.2, BSA 0.2 %, Na<sub>3</sub>N 0.2 %). Para las células de la condición (c) se realizó un marcaje sencillo con anti CD4 a una dilución 1:10, para conocer el total de células CD4+ presentes en la muestra. Para las células de la condición (d) se realizó un doble marcaje con anti-CD69-FITC/anti-CD4 PE, a dilución 1:5 y anti-CD25-FITC/anti-CD4-PE a dilución 1:5 (Beckton & Dickinson, PharMingen, USA), para la obtención de las linfocitos CD4+ que expresan CD25 y CD69 respectivamente. Todas las incubaciones se realizaron a 6°C durante 20 minutos, posteriormente las células se lavaron dos veces con PBS-BSA-Azida y fueron fijadas con paraformaldehído al 1%. El número total de células con los diferentes marcadores fue obtenido mediante citometría de Flujo (FACS Calibur, Beckton & Dickinson, USA.) y analizadas con el programa Cell Quest.

## Medición de carga viral

Para medir carga viral se utilizó el método de amplificación de ácidos nucleicos con el equipo comercial Amplicor HIV-1 <sup>®</sup> Monitor test versión 1.5 (Roche diagnostics Branchburg, NJ), cuyo límite de detección es de 50 copias/ml.

Principio del método: el RNA del HIV-1 es aislado del suero mediante lisis de las partículas virales con un agente chaotrópico, seguido de la precipitación de RNA con alcohol. Ya que el RNA no es un sustrato eficiente para la taq DNA polimerasa, es necesario realizar el proceso de transcripción reversa antes de iniciar el proceso de amplificación de PCR. La transcripción reversa genera una copia de la cadena de RNA complementaria a la cadena de DNA, que puede ser sometida al proceso de amplificación por PCR. Este implica ciclos repetidos de desnaturalización, alineación y extensión del DNA, dando lugar a múltiples copias del blanco inicial. El material es transferido a un fotómetro donde la absorbancia es leída en 660nm.

Interpretación de resultados.

Copias /ml.

$$\frac{\text{Absorbancia de la muestra} \times \text{factor de dilución} \times \text{copias de PCR} \times \text{factor de dilución}}{\text{Total de la absorbancia del estándar cuantificado} \times \text{factor de dilución serial}}$$