



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES**

**CUAHUTITLAN**

**METODO PRACTICO PARA LA PURIFICACION DE  
ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A :**

**Gilberto Enrique Erosa de la Vega**

**CUAHUTITLAN, EDO. DE MEX.**

**1980**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## I N D I C E

Pág.

CAPITULO I.	INTRODUCCION	1
	ANTECEDENTES HISTORICOS	1
	TERMINOLOGIA	4
CAPITULO II	HEPATITIS VIRALES.	
	a) CARACTERISTICAS CLINICAS.	6
	b) HEPATITIS VIRAL TIPO B.	9
	1) MORFOLOGIA.	9
	2) ANTIGENO SUPERFICIAL DE LA HEPATITIS B.	9
	3) ANTIGENO CENTRAL DE LA HEPATITIS B	12
	4) ANTIGENO "e" DE LA HEPATITIS B.	13
	5) SUBDETERMINANTES DEL ANTIGENO SUPERFICIAL DE LA HEPATITIS B.	
CAPITULO III	METODOS DE PURIFICACION DE A <sub>gs</sub> HB.	17
	1) ULTRACENTRIFUGACION.	17
	2) INMUNOADSORCION.	18
	3) CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.	19
	4) PRECIPITACION.	19

		Pág.
CAPITULO IV	MATERIAL Y METODOS.	21
CAPITULO V	PRINCIPIOS DEL METODO. DISEÑO EXPERIMENTAL	33 35
CAPITULO VI	RESULTADOS	36
CAPITULO VII	CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFIA		46

## INTRODUCCION

### 1. ANTECEDENTES HISTORICOS

El descubrimiento del antígeno Australia y sus consecuencias se han convertido en una de las investigaciones clásicas de la ciencia médica. Este se inició como un estudio dirigido al polimorfismo genético de las lipoproteínas séricas humanas, enfocado particularmente a la etnología del Sureste de Asia (1). A mediados de la década de los sesentas, el Dr. Baruch Blumberg comenzó un estudio enfocado hacia las diferencias antigénicas de las lipoproteínas séricas, sin imaginarse que su trabajo produciría uno de los descubrimientos más importantes, en un campo en el que él nunca había incursionado y que además por aquel entonces se encontraba estancado. Usando plasma y sueros de pacientes politransfundidos como antisueros, el Dr. Blumberg por medio de la doble difusión en agar, demostró arcos de precipitación formados entre estos antisueros y sueros humanos de diferentes orígenes, así, el suero de un aborigen australiano fue capaz de producir arcos de precipitación con varios de los antisueros hemofílicos. Posteriormente al intentar caracterizar esta proteína, se dió cuenta de que no correspondía a una lipoproteína como inicialmente se había pensado y como este nuevo antígeno fue encontrado en un aborigen australiano se le puso el nombre provisional de antígeno Australia. (2) Intentando encontrar una singifi-

cación biológica a su descubrimiento, Blumberg y colaboradores, encaminaron sus esfuerzos para ver si existía alguna relación con la leucemia humana (1).

Posteriormente, al estudiar la presencia del antígeno Australia en una población de pacientes con síndrome de Down, encontraron que además de detectarse este antígeno con gran frecuencia, su positividad correlacionaba con la hepatitis viral.

La relación entre antígeno Australia y hepatitis, la dió a conocer Blumberg en 1967, sin embargo, existían problemas metodológicos que impedían establecer de manera categórica que el antígeno Australia correspondiera como el agente etiológico de la hepatitis; los obstáculos eran los siguientes:

- a) hasta la fecha ha sido imposible cultivar "in vitro" al virus de la hepatitis;
- b) no existía un modelo animal en el cual se pudiera reproducir la enfermedad (en la actualidad se puede reproducir en chimpancé y mandril).

No obstante los avances en la inmunología, como los llevados a cabo en microscopía electrónica, y posteriormente con la combinación de ambas fue como se pudo definir la primera entidad serológica del virus de la hepatitis B, lo que en la actualidad se conoce como antígeno de superficie de la hepatitis B.

En 1968 Alfred Prince, trabajando en el New York Blood Center en la búsqueda de un marcador serológico para las sangres

portadoras de hepatitis B y empleando también como fuente de anticuerpos, sueros de personas politransfundidas. Siguió a un grupo de pacientes recién transfundidos, haciéndoles chequeos dos veces por semana, con la esperanza de poder estudiar la enfermedad desde sus inicios. En el mismo año (4) Prince describió un antígeno al cual llamó antígeno de la hepatitis sérica y dió razones para creer que el antígeno por él descrito correspondía al antígeno Australia descrito por Blumberg, lo que posteriormente se confirmó (5).

En base a estos primeros descubrimientos, los conocimientos acerca de la hepatitis viral tipo B se han incrementado impresionantemente, tanto en su epidemiología, como en su relación con algunas entidades patológicas, tales como la hepatitis crónica activa y hepatitis crónica persistente.

Además el estudio del agente causal en cuanto a su composición y características biofísicas, ha permitido hacer aplicaciones tanto diagnósticas como en medicina preventiva disminuyéndose notablemente la hepatitis postransfusional.

TERMINOLOGIA

El informe del comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud de 1977 propone la siguiente nomenclatura, basada en los descubrimientos más recientes. Propone eliminar las letras a modo de subíndice, así por ejemplo, para el antígeno superficial de la hepatitis B la abreviatura sería AgsHB en lugar de Ag<sub>s</sub>HB.

## HEPATITIS VIRAL TIPO B.

- VHB Virus de la hepatitis B: Virus de doble doble cubierta de 42nm de diametro, conocido originalmente como partícula de Dane.
- AgsHB Antígeno de superficie de la hepatitis B: se encuentra en la superficie del virus y sobre la partícula esférica de 22nm de diametro y la partícula tubular de 22nm de diametro y longitud variable.
- AgcHB Antígeno central de la hepatitis B: representa la cubierta interior del virus.
- AgeHB Antígeno "e" de la hepatitis B: no se conoce exactamente su localización en las diferentes entidades morfológicas del virus.

**Anti-HBs**                    **Anticuerpo contra el antígeno de superficie de la hepatitis B.**

**Anti-HBc**                    **Anticuerpo contra el antígeno central de la hepatitis B.**

**Anti-HBe**                    **Anticuerpo contra el antígeno "e" de la hepatitis B.**

## HEPATITIS VIRALES

### a) CARACTERISTICAS CLINICAS.

Las hepatitis virales son enfermedades sistémicas que se desarrollan inicialmente en el hígado y que en la mayoría de los casos corresponde a uno de dos agentes plenamente reconocidos: Virus de la hepatitis A (hepatitis infecciosa o de periodo de incubación corto) y el Virus de la hepatitis B (hepatitis sérica o de periodo de incubación largo).

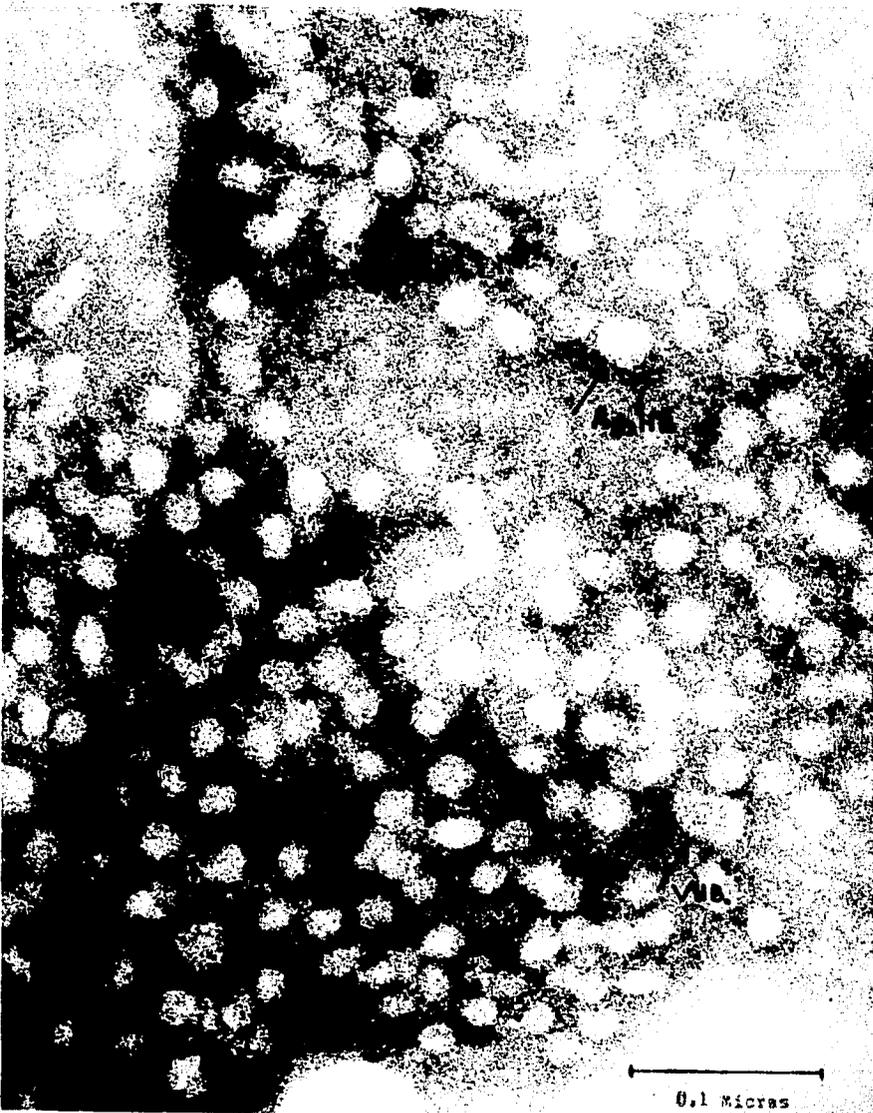
Recientemente han aparecido numerosos reportes de hepatitis debida a un tercer agente supuestamente viral conociéndose hasta el momento como hepatitis no A no B.

La tabla 1 presenta las características clínicas y epidemiológicas de las hepatitis A y B.

Ambos agentes producen una característica pero indistinguible lesión en el hígado, la diferenciación clínica es rara vez concluyente, por la forma extremadamente diferente en que se presenta la enfermedad, que puede ir desde una infección asintomática con presencia o no de ictericia hasta una hepatitis fulminante y la muerte.

La fase prodromal o preictérica es frecuentemente caracterizada por fatiga, malestar general, mialgias, síntomas de infección en las vías respiratorias superiores, asco al tabaco, erupción

maculopapular, artralgias, fiebre, diarreas, nauseas y vomito. Esto es acompañado de dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen, lo que esta asociado a la hepatomegalia y a la aparición de la ictericia, el diagnóstico se confirma ademas de los datos clínicos por la hiperbilirubinemia y la elevación de las transaminasas. La hepatitis viral aguda dura un promedio de tres meses si persiste por más tiempo se le cataloga como crónica, los pacientes que sufren hepatitis viral aguda por lo general se recuperan completamente.



0.1 micras

## b) HEPATITIS VIRAL TIPO B.

### 1) MORFOLOGIA.

Las partículas circulantes asociadas con el virus de la hepatitis B (VHB) pertenecen por lo menos a tres categorías morfológicas distintas:

- i) Partículas esféricas de diámetro medio de 22nm.
- ii) Partículas tubulares de diámetro medio de 22nm y longitud variable.
- iii) El VHB propiamente dicho, partícula esférica de 42nm de diámetro de doble cubierta, en la parte central contiene ADN y ADN-polimerasa, presentando heterogenicidad en el contenido de estos dos últimos componentes.

VER FOTOGRAFIA 1.

### 2) ANTIGENO SUPERFICIAL DE LA HEPATITIS B.

Basándose en estudios de inmunomicroscopía electrónica el AgsHB existe en las tres categorías morfológicas antes mencionadas, la capa externa del AgsHB mide 7nm y es antigénicamente idéntica a las esferas de 22nm y a los túbulos lo que indica que estas dos partículas representan un exceso de recubierta viral. La partícula de 22nm que está asociada al AgsHB tiene una compleja composición bioquímica, consta de 7 a 9 polipeptidos, dos de los cuales son glucoproteínas y contienen colesterol, tres lípidos polares y dos glucolípidos. Debe hacerse notar que la composición de aminoácidos del AgsHB difiere marcadamente con las de otros virus animales (tabla 2y3).

CARACTERISTICA.	HEPATITIS A.	HEPATITIS B.
período de incubación	15-50 días	40-180 días
Tipo de inicio	Agudo	Incidioso
Distribución por edad	Niños y adultos jóvenes	Todas las edades
Incidencia por estación	Otoño primavera	Todo el año
Ruta de infección	Principalmente fecal-oral	Principalmente parenteral
Ocurrencia virus/antígeno Sangre Heces Orina	Días Semanas-meses ----	Meses-años Presente Presente
Características de lab. Fiebre +38°C Duración de elevación de transaminasas AgS <sub>HB</sub> -ANTI-HBs	Al principio  1-3 semanas	Menos común  1-6 meses o más Presente
Inmunidad Homóloga Heteróloga	si no	si no
Duración Inmunidad	Probablemente toda la vida	Probablemente toda la vida
Terapia con Globulina	Efectiva	Efectiva

TABLA 2. COMPOSICION QUIMICA DEL AgsHB.  
COMPOSICION DE AMINOCIDOS.

Lisina	1.7	±	0.4	Moles/Mol de AgsHB.
Histidina	0.6	±	0.2	
Arginina	3.1	±	0.5	
Ac. Aspártico	5.3	±	0.3	
Treonina	7.8	±	0.4	
Serina	8.3	±	0.6	
Ac. Glutámico	5.6	±	0.6	
Prolina	11.6	±	0.4	
Glicina	7.7	±	0.4	
Alanina	4.0	±	0.4	
Cisteína	4.8	±	0.6	
Valina	5.9	±	0.6	
Metionina	1.4	±	0.6	
Isoleucina	6.2	±	0.7	
Leucina	16.7	±	0.5	
Tirosina	1.1	±	0.7	
Fenilalanina	8.0	±	0.6	

TABLA 3 COMPOSICION DE LIPIDOS POLARES.

Fosfatidil colina	65%
Esfingomiélinea	30%
Isofosfatidilcolina	5%
Glicoesfingolípido	--

Por otra parte, las preparaciones AgsHB altamente purificadas y representadas principalmente por partículas de 22nm presentan un alto grado de heterogenicidad biofísica en terminos de diámetro peso molecular y carga total de las proteínas de su superficie (11).

El AgsHB es termoestable, preparaciones purificadas de éste mantienen actividad antigénica después de calentarse 10 horas a 60°C (12), pero calentandose a 100°C por 10 minutos se elimina por completo su afinidad por el anticuerpo.

### 3) ANTIGENO CENTRAL DE LA HEPATITIS B.

Las partículas del VHB se componen de una partícula central de 27nm de diámetro con una cubierta de 7nm de espesor. Tratando estas partículas con detergente se logra separar la cubierta exterior de 7nm de espesor que corresponde al AgsHB y el componente interior de 27nm (13) que tiene características antigénicas diferentes al AgsHB y que corresponde al antígeno central de la hepatitis B AgcHB, el cual se localiza en hepatocitos de humano, chimpance y mandril también se detecta en el suero de personas infectadas.

Se ha tratado de relacionar la infectividad de un suero AgcHB positivo midiendo la proporción entre la actividad de la ADN-polimerasa y el titulo de AgcHB (15), pero esta relación no puede dar idea de la infectividad real del suero por la existencia de partículas de virus incompletas en su contenido de ADN y ADN-polimerasa lo cual puede dar una partícula con ADN-polimerasa y con ADN incom

pletos o carente en alguno de los dos, las cuales no pueden dar un valor fidedigno de infectividad. (9,14).

#### 4) ANTIGENO "e" DE LA HEPATITIS B.

El antígeno de la hepatitis B del que se tiene menos información es el antígeno "e", que fué descrito inicialmente en 1972 (17) como un nuevo sistema antígeno-anticuerpo presente en casos agudos de hepatitis B y en portadores crónicos de AgsHB. El antígeno "e" ha sido sido caracterizado por varios autores como un dímero de IgG o al parecer relacionado estructuralmente con esta inmunoglobulina (18). Se ha sugerido también que el antígeno "e" representa un determinante idiotípico localizado en la subclase 4 de la IgG (19), por otro lado se ha presentado evidencia de que el antígeno "e" esta asociado a la isoenzima 5 de la lactato deshidrogenasa (20). Con este antígeno si se ha podido determinar la infecciosidad de un suero ya que en portadores sanos existe Anti-HBe y no se detecta ADN-polimerasa, siendo que en pacientes crónicos no se detecta ni antígeno "e" ni su correspondiente anticuerpo en cambio si se ha logrado detectar actividad de ADN-polomerasa.

La detección de este antígeno se hace principalmente por la técnica de doble difusión en agar, pero recientemente se ha utilizado el radioinmunoensayo (16) en el cual se hace destacar la importancia que puede revestir la detección de este antígeno y su anticuerpo en portadores crónicos de AgsHB así como en pacientes con hepatitis crónica activa y hepatitis crónica persistente.

En la tabla 4 se presenta un resumen de los antígenos de las hepatitis virales.

#### 5) SUBDETERMINANTES DEL ANTIGENO SUPERFICIAL DE LA HEPATITIS B.

El AgsHB lleva un determinante común "a" y varios subdeterminantes principales determinados por el genoma del virus y no por el huésped. Los determinantes pueden ponerse de manifiesto por la proyección de líneas de no identidad en la prueba de doble inmunodifusión con los reactivos adecuados. Se han identificado 8 grupos distintos y dos grupos mixtos de subtipos (21), consisten de varias combinaciones de los determinantes "y", "d" e "y", "r". Además otras variantes se describían originalmente como relacionadas con el determinante común "a" pero es más exacto designar como variantes de la especificidad "w" puesto que siempre se comporta como alelos de "r", los 10 grupos son los siguientes.

1	ayw1	(a <sub>1</sub> yw)	6	adw2	(a <sub>1</sub> dw)
2	ayw2	(a <sub>1</sub> <sup>2</sup> yw)	7	adw4	(a <sub>3</sub> dw)
3	ayw3	(a <sub>2</sub> <sup>3</sup> yw)	8	adr	
4	ayw4	(a <sub>3</sub> yw)	9	adwy	
5	ayr		10	adyr	

Los determinantes principales se comportan como si comprendieran dos grupos alélicos "d" e "y" de una parte y w1, w2, w3, w4 y "r" de la otra, sin embargo, es posible que estos sistemas no sean completamente independientes, puesto que dos de las 4 variantes "w"

## VIRUS

## ANTIGENO

ENTIDADES MORFOLOGICAS Y SU RELACION  
CON EL VIRUS

## ANTICUERPO.

Hepatitis B	Antígeno de superficie de la hepatitis B. AgsHB.	Esferas de 22nm (exceso de cubierta viral) tubulos de 22nm de diámetro y longitud variable. Cubierta de la partícula 42nm (partícula de Dane ).	Anti-HBs
	Antígeno central AgcHB	Partícula de 27nm dentro de la partícula de Dane.	Anti-HBc
	Antígeno e	Relacionado con el AgsHB en la partícula de 27nm.	Anti-HBe
Hepatitis A	Antígeno de la hepatitis A AgHA	Partícula de 27nm.	Anti-HA
No A, No B.	No identificado	No identificado	No identificado.

(allados con "y") se han podido encontrar con "d".

Los grupos mixtos de subtipos son raros y es posible que resulten de una mezcla fenotípica o genotípica de los determinantes en el curso de una infección simultánea de dos virus con diferente genotipo. También se han descrito otras especificidades del AgsHB tales como "g", "x", "f", "t", "j", "n" y "h", pero pero no se han comprobado por medio de buenas y necesarias comparaciones serológicas.

Por lo que toca al antígeno "e" se han encontrado dos serotipos diferentes designados AgeHB1 y AgeHB2.

## MÉTODOS DE PURIFICACION DE AgsHB.

La purificación y caracterización de las distintas categorías morfológicas del VHB es el primer requerimiento para el entendimiento de la naturaleza, origen e infectividad del mismo, así como para el desarrollo de técnicas serológicas para su detección.

Como el antígeno más abundante en la infección por VHB es el AgsHB el cual está presente en las tres categorías morfológicas del virus, resulta ser el marcador antigénico ideal para la detección de la enfermedad. Por lo tanto se ha desarrollado una amplia variedad de métodos para su purificación, principalmente de las partículas de 22nm compuestas únicamente por AgsHB.

A continuación se hará una breve descripción de los principales métodos usados en la purificación del AgsHB.

### 1) ULTRACENTRIFUGACION (22, 23, 24.)

Esta técnica tiene una gran limitación por lo costoso y especializado del equipo que se requiere, y por lo tanto no es aplicable como un método generalizado de purificación de AgsHB, además de que por este método no es posible eliminar completamente las proteínas séricas que se encuentran unidas al AgsHB, a menos que exista una prepurificación o tratamiento especial para eliminarlas, en si la técnica es eficiente cuando se usan preparaciones semipurificadas de AgsHB.

Pero no cuando se efectua la purificación directa a partir de suero entero, a menos que se hagan reciclajes de el mismo en gradientes de cloruro de cesio.

Brevemente, la técnica consta de dos ciclos de bandeado isopícnico en cloruro de cesio seguido por una sedimentación zonal en sacarosa y finalmente un último bandedo isopícnico en cloruro de cesio (22), con este método se obtienen preparaciones altamente purificadas de partículas de 22nm de AgsHB.

## 2) INMUNOADSORCION

L.B. Howen y colaboradores (25) describen una completa separación del AgsHB de proteínas séricas humanas usando dos tipos de inmuno-adsorbente, la primera inmunoadsorción se lleva acabo con Anti-HBs unido covalentemente a Sepharosa (Polímero de agarosa) y la segunda Anti-suero normal humano unido también a Sepharosa, estos dos pasos fueron necesarios ya que las preparaciones obtenidas por elución AgsHB del primer inmunoadsorbente todavia contenian grandes cantidades de proteínas séricas humanas. Grabow (26) y Jozwiak (27) reportan preparaciones de AgsHB libres de proteínas séricas a partir de un solo inmunoadsorbente, la discrepancia entre ellos y Howen tal vez se deba a la sencibilidad de las técnicas usadas para la detección de las proteínas séricas que fueron hemaglutinación por parte de Houwen que es una técnica mucho más sencible que la inmunodifusión, técnica utilizada por Grabow y Jozwiak.

Esta técnica es demasiado elaborada, además de que los reactivos tienen una vida media de utilización muy corta y por lo tanto su costo resulta elevado, por otro lado no se puede aplicar a gran

escala.

### 3) CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

A.R. Neurath (28) describe un método basado en las observaciones de Cowly (29) que indica que la concanavalina A precipita parcialmente al AgsHB, y sugiere la utilización de esta característica para ser utilizada como un paso en la purificación de AgsHB. Con este método se obtienen preparaciones que contienen aparte de AgsHB varias proteínas séricas, principalmente: IgM, IgA, alfa 1 antitripsina, alfa 2 macroglobulina, haptoglobina, ceruloplasmina y componentes del complemento que representan el 15% del total de las proteínas de las que se partió y el porcentaje de antígeno recuperado no supera el 30%. El uso de columnas de afinidad (concanavalina A-Sepharosa) o precipitación directa con concanavalina A no es un factor determinante pues con las dos se obtienen los mismos resultados. Por otro lado se requiere de técnicas auxiliares para llegar a una purificación más completa, en fin, la técnica no ofrece ventajas en lo que se refiere a tiempo, material, costo y rendimiento.

### 4) PRECIPITACION.

Las técnicas de precipitación han sido las más desarrolladas últimamente pues son susceptibles de aplicación a gran escala, su costo es relativamente bajo y su rendimiento es siempre mayor al 50% (27-30).

Recientemente la combinación de la cromatografía en gel y la precipitación principalmente con polietilen glicol 6,000 han dado paso

a la producción masiva de vacunas para hepatitis viral tipo B (28,30)

En este trabajo se describe un método simple de dos pasos para la purificación de AgsHB haciendo una combinación de las técnicas de precipitación y cromatografía en gel utilizando un mínimo de equipo y material con el fin de obtener pequeñas cantidades de AgsHB altamente purificado para su uso en estudios de caracterización y producción de sueros monoespecíficos para la detección del mismo.

**MATERIAL Y METODOS****Materiales Biológicos.****Fuente de AgsHB.**

El AgsHB fue purificado a partir de unidades de sangre de donadores profesionales aparentemente sanos, obtenidos en la sección de Histocompatibilidad del Laboratorio Clínico del Centro Hospitalario 20 de Noviembre I.S.S.S.T.E.

**Fuente de Anti-HBs**

Se obtuvo a partir de unidades de sangre de donadores profesionales y de pacientes en tratamiento de hemodialisis de la Sección de Histocompatibilidad del C. H. 20 de Noviembre I.S.S.S.T.E.

**Anti-Suero normal humano de cabra**

**Suero humano AgsHB positivo (control) Lab. Hoech.**

**Estándar de proteínas "LABTROL" 6.5 mg/100 ml.**

## DETERMINACION DE PROTEINAS

Método semi-micro de Lowry (44).

La cuantificación de proteínas por medio del reactivo de Folin-Ciocalteu (a base de fenol) depende sobre el contenido de tirosina y triptofano de la muestra, por lo tanto el estándar y la muestra que se usen deberán ser lo más parecidos que se pueda. Para esta técnica se usó el estándar de proteínas Labtrol (DADE).

## MATERIALES

- Gradillas
- Tubos de ensaye
- Baño María 50° C
- Espectrofotómetro

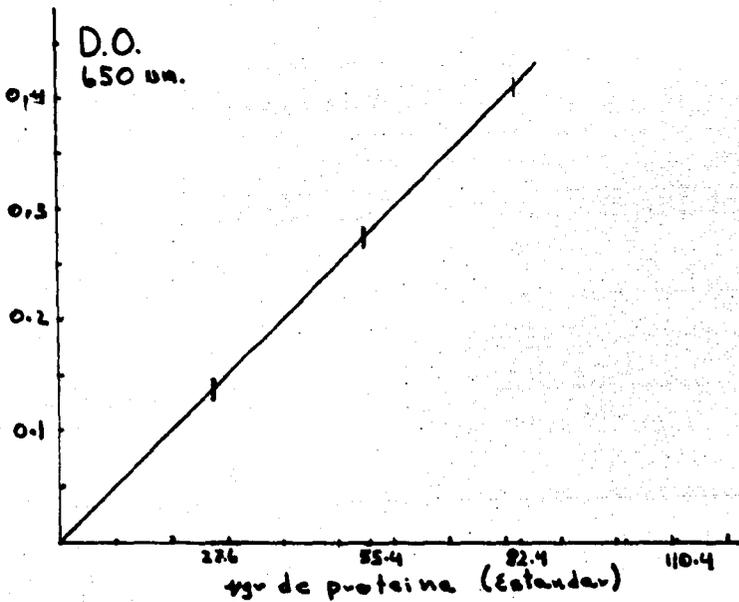
Solución A: 2 gramos de tartrato de sodio y potasio y 100gr de carbonato de sodio se disuelven en 500 ml de NaOH 1N y se lleva un litro con agua destilada.

Solución B: 2 gramos de tartrato de sodio y potasio y un gramo de sulfato de cobre pentahidratado disueltos en 90 ml de agua destilada más 10 ml de NaOH 1N.

Solución C. Reactivo de Folin-Ciocalteu (SIGMA DE MEXICO), diluido 1/15.

Método: Se prepara una serie de tubos numerados y los reactivos se añaden como lo indica el cuadro siguiente.

Tubo	B	1	2	3	4	5	6	7
Estándar	-	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	-	-
Muestra	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1 1/10
H <sub>2</sub> O	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.9	0.9
Sol. A	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
Calentar 10min 50°C.								
Sol. B	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Temperatura ambiente 10min.								
Sol. C	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Calentar 10min 50°C. Leer a 650 nm.								





## PREPARACION DE AGAR AL 1%

a) En un vaso de precipitados se colocan 50 ml de agua destilada, se añade un gramo de agar noble DIFCI, se calienta en baño maría con agitación constante hasta que el agar se disuelva completamente.

b) Se deja gelificar el agar en el mismo vaso, después de lo cual, se saca el bloque y se parte en cuadros pequeños, éstos se devuelven al vaso, el cual se tapa con una gasa y se pone bajo el chorro de agua corriente por toda la noche con el fin de lavar el agar.

c) Se elimina del vaso la mayor cantidad de agua que sea posible y se añaden 50 ml de buffer de barbituratos y se calienta a fuego lento hasta que funda el agar evitando la ebullición, o si se prefiere se puede fundir en baño maría. Las pérdidas por evaporación se reponen con el mismo buffer. Por último se añade mertiolate a una concentración final de 1/10,000.

d) Se llenan las cajas de plástico que deben estar limpias y desengrasadas, añadiendo el suficiente agar para formar una capa de 3 mm de espesor. Esta operación se lleva a cabo sobre una table nivelada.

e) Las placas se guardan en un recipiente húmedo a 4° C, hasta su utilización.

## CONTRAINMUNOELECTROFÓRESIS (Principio)

La técnica de contrainmunolectrofóresis (CIEF) representa una variante de la inmunodifusión simple de OutCherlony con dos ventajas:

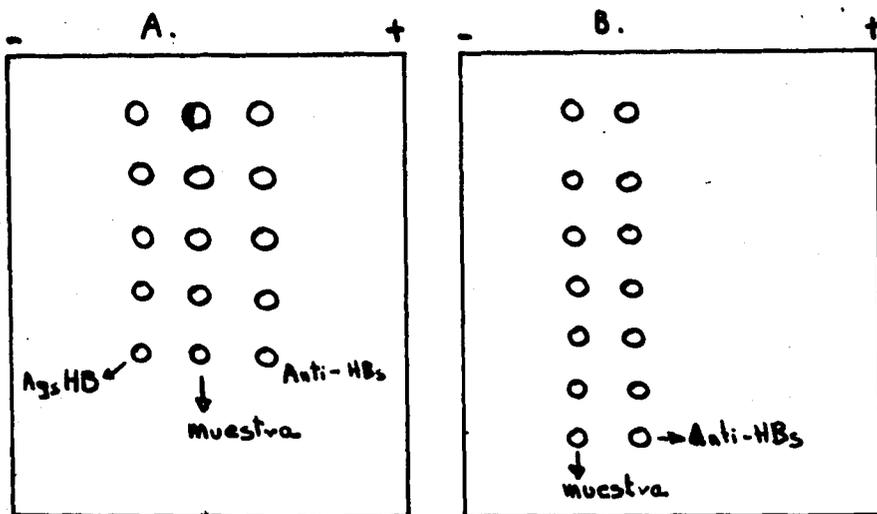
- a) Incrementa la concentración de los reactivos en el sitio de precipitación. El AgsHB se mueve en la zona de las alfa 2 globulinas; el cuerpo se mueve en la dirección contraria con la fracción gamma, así ninguno de los reactivos sufre disminución de su concentración, aumentándose de esta manera la sensibilidad.
- b) La movilidad de antígeno y anticuerpo bajo el influjo de la corriente eléctrica hace que la técnica se lleve a cabo en un tiempo máximo de dos horas. La formación de la banda de precipitación ocurre de manera similar que en la difusión simple. El método se basa en el principio de que el AgsHB a un pH alcalino se encuentra cargado negativamente y migra hacia el ánodo en la electrofóresis, por lo contrario los anticuerpos (gmmaglobulinas) a pH de 8.6 se hallan cerca de su punto isoeléctrico y por lo tanto tienen una débil carga negativa y tienden a moverse hacia el cátodo debido a formas endosmóticas provocadas principalmente por los contaminantes de agaropectina que contiene el agar.

## PROCEDIMIENTO CIEF

- a) Se sacan las placas necesarias del refrigerador y se exponen al aire 5 minutos para eliminar el agua residual, después de

perforar las placas como lo indican los dibujos de la página siguiente, dependiendo de la muestra con que se esté trabajando. La forma A es para detectar AgsHB y Anti-HBs al mismo tiempo en suero y la forma B es para titular sueros, muestras procesadas y fracciones de cromatografía, los reactivos se colocan como lo indican los dibujos.

- b) Se coloca la placa en la cámara de electrofóresis y se cierra el circuito con tiras de fieltro unidas a los extremos de la placa.
- c) Aplicar las muestras y antisueros.
- d) Correr la electrofóresis a 15 mA aproximadamente una hora para obtener un buen desarrollo de bandas.
- e) Leer resultados y dejar lavando la placa en solución salina por toda la noche, al día siguiente confirmar resultados.



## INMUNOELECTROFORESIS (Principio)

La inmunolectroforesis es una técnica por medio de la cual se estudian sistemas antígeno-anticuerpo, está basada en dos propiedades:

- a) La habilidad de un sistemas antígeno-anticuerpo para formar bandas de precipitación en el gel de agar, y
- b) La movilidad característica que presenta una proteína dada cuando es sometida a la acción de una corriente eléctrica, la técnica ha demostrado ser útil para detectar e identificar componentes individuales de sistemas multiproteicos, monitorear la eficacia de sistemas de purificación y también para reconocer proteínas isotópicas en ciertos estados patológicos de fluidos proteicos humanos.

## PROCEDIMIENTO (IEF)

- a) Se sacan las placas necesarias del refrigerador y se exponen 5 minutos al ambiente para que se evapore el agua residual después se perfora el gel con el perforador adecuado.
- b) Colocar la placa en la cámara de electroforesis y cerrar el circuito con las tiras de fieltro.
- c) Colocar las muestras en los orificios correspondientes (ya mezcladas con azul de bromofenol).
- d) Correr la electroforesis a 15mA por placa por una hora.
- e) Retirar las placas de la cámara de electroforesis y desalojar

el agar del canal central, el cual se llena con el antisuero deseado .

f) La placa se coloca en una cámara húmeda a temperatura ambiente por 25 horas para que las bandas de precipitación se desarrollen a su máximo.

g) Después la placa con solución salina fisiológica la cual se debe cambiar constantemente, una vez lavada la placa se coloca sobre ésta un papel filtro y se deja secar completamente.

h) Ya que la placa esta seca se añaden 5ml de una solución de rijo de Ponceau en ácido tricloroacético al 5%, dejandose teñir la película de agar por tres minutos, después de lo cual se lava la película varias veces con ácido acético al 5% hasta que el colorante se elimine, se coloca un papel filtro sobre la película y se deja secar nuevamente, la película se recupera con cinta adhesiva transparente.

## CROMATOGRAFIA EN GEL (Principio).

Una de las más útiles y poderosas herramientas para la separación de proteínas en base a su peso molecular, es la cromatografía en gel, también llamada cromatografía de exclusión molecular, filtración en gel y cromatografía de tamizado molecular.

En la cromatografía en gel la mezcla de proteínas disuelta en el amortiguador apropiado se deja fluir por gravedad o por medio de bombas peristálticas a través de una columna empacada con diminutas esferas de un material inerte altamente polimerizado e hidrofílico que ha sido previamente lavado y equilibrado con el amortiguador, los materiales más comúnmente usados para este tipo de cromatografías son el Sephadex (polímero de dextran), Biogel (polímero de acrilamida), Shepharosa (polímero de agarosa) y Ultrogel (acrilamida y agarosa). Todas las anteriores pueden prepararse con diferentes grados de porosidad interna, en la columna las proteínas de bajo peso molecular penetran al interior de las esferas y así viajan a través de la columna con diferentes velocidades dependiendo por supuesto de su peso molecular, las proteínas de alto peso molecular no penetran en las esferas por lo tanto se dice que son excluidas y permanecen en el volumen de exclusión de la columna definido como el volumen de la fase acuosa fuera de las esferas.

### PROCEDIMIENTO.

El procedimiento que se siguió es el recomendado por el fabricante

a) TRATAMIENTO PREELIMINAR DEL GEL.

Comercialmente el Ultrogel se presenta en forma hidratada, por lo que se trata en fôrma un poco diferente a los demás geles que bienen en forma deshidratada, primero se calcula el volûmen de la columna multiplicando el area de su base por la altura que se le quiera dar a la columna, siendo el area de la base de  $4.9\text{cm}^2$  y la altura de 70cm por lotanto el volûmen de gel requerido es de  $343\text{cm}^3$  pero se toman 350 para compensar las perdidas por manejo.

b) Agitar suavemente el frasco conteniendo el Ultrogel hasta que este pueda servirce en un matraz Erlenmeyer o preferentemente Kitazato.

c) Añadir 250ml de SSA y resuspender el gel completamente , conectar el kitazato a una bomba de vacio y deaerear el gel por 30min. con agitación continua.

d) Montar la columna verticalmente, conectar el ensamblador final 10cm arriba de la base de la columna cerrando la via de salida, añadir el gel a la columna con la ayuda de un agitador de vidrio para evitar la formación de burbujas, una vez que la columna este llena se abre la via de salida o se conecta la bomba peristáltica, ajustando el flujo a 15ml por hora. Este procedimiento se repite hasta que la columna alcance la altura deseada.

e) Ya que el gel esta empacado se conecta el adaptador de flujo en la parte superior de la columna y este a su vez se conecta con el reservorio de SSA, la cual debe ser deaereada.

f) La columna se tiene que equilibrar por lo menos con un litro de SSA al al flujo con el cual se correrá la cromatografía.

g) Colocación de la muestra. El volumen de la muestra que sera aplicada se determina en base al volumen total del gel, y como regla para obtener una buena resolución el volumen de la muestra tendra que ser de 0.5% a 4.0% del volumen total del gel..

La muestra se coloca de la siguiente manera.

- 1) Desconectar el adaptador de flujo.
- 2) Retirar el amortiguador de la parte superior del gel sin remover este.
- 3) Colocar la muestra con una pipeta Pasteur, sin remover el gel, y esperar a que la muestra entre completamente a éste.
- 4) Añadir amortiguador sobre la parte superior del gel hasta una altura de 5cm y colocar de nuevo el adaptador de flujo.

h) Desarrollo de la cromatografía. La vía de salida columna se conecta al colector de fracciones, recogándose fracciones de 5ml las cuales se leen en cubetas de 1cm de paso de luz y a 280nm de longitud de onda en el espectrofotómetro graficándose los resultados en densidad óptica contra volumen eluido de la columna (36,43).

## PRINCIPIOS DEL METODO.

La precipitación selectiva de proteínas específicas a partir de fluidos biológicos heterogéneos es una importante y valiosa técnica en muchos procedimientos de purificación bioquímica. En el presente los precipitantes más comúnmente usados son, sales inorgánicas tales como los sulfatos de sodio y amonio, y solventes orgánicos como el etanol. Las tienen carencia de selectividad y los segundos requieren estrictos controles de temperatura y pH (37).

La precipitación de proteínas con polímeros solubles en agua tales como el polietilén glicol, polipropilén glicol, polivinil pirrolidona y dextranes ha sido reportada por varios autores. Polson (34) concluyó que el polietilén glicol (PEG) de peso molecular 6000 era el precipitante más útil para uso general ya que sus soluciones son fácilmente manejables y no causa desnaturalización de las proteínas, aunque la precipitación con PEG es dependiente del pH el control de la temperatura y fuerza iónica resultan innecesarios.

Se ha descrito que la precipitación con PEG es estrictamente reversible (39) y que el polímero es fácilmente removible por filtración en gel o cromatografía de intercambio iónico.

También se ha presentado alguna información cuantitativa sobre la precipitación con PEG de varias proteínas plasmáticas, los datos concuerdan con lo presentado por Laurents (40,41), el cual indica que las proteínas de peso molecular alto son las que precipitan primero.

Lo mencionado anteriormente es lo que se toma como base en este trabajo, el proposito es eliminar las proteínas de alto peso molecular del suero y luego pasar el sobrenadante resultante por una columna de gel que sea capaz de separar las proteínas relativamente grandes que permanecen en éste, así como el AgsHB. El gel usado en este estudio tiene un rango de exclusión de 100,000 daltons, Chenboro (37) y Eiarss (28) describen que unas concentraciones de PEG de 5 y 5,5 respectivamente son capaces de precipitar las lipoproteínas en su totalidad, las cuales tienen un peso molecular de 3,200,000. daltons, así como una buena parte de la IgM (1,000,000.) y la alfa 2 macroglobulina (820,000.). Como se puede apreciar estas dos últimas proteínas tienen un peso molecular que está dentro del rango efectivo de separación del gel. Por lo tanto la hipótesis planteada fué Precipitar las proteínas de alto peso molecular con PEG a una concentración de 5.5% y pasar el sobrenadante por la columna de gel para así obtener AgsHB con un grado de pureza aceptable, utilizando un mínimo de equipo y tiempo para su desarrollo. En cada paso de la purificación se hacen pruebas de control las cuales son; Contrainmunolectroforesis CIEF, Inmunolectroforesis IEF, y Electroforesis en gel de acrilamida EGA.

### DISEÑO EXPERIMENTAL.

Los sueros AgsHB positivos se titulan por medio de CIEF usándose solamente aquellos con un título mayor de 1/16. A los sueros escogidos se les determina proteína por medio de la técnica semi-micro de Lowry.

Se toman 10ml de suero y se dializan exhaustivamente contra SSA, si hay precipitado se retira por centrifugación.

Se añade una solución de PEG al 40% al suero hasta alcanzar una concentración final del 5.5%, la solución se mantiene a 4°C por dos horas (27,28).

El precipitado formado se sedimenta por centrifugación a 4,550xg y se descarta después del analisis de las proteínas precipitadas por medio de IEF y EGA, además de la determinación cuantitativa de proteínas.

El sobrenadante se dializa contra SSA para eliminar la mayor cantidad posible de PEG y así facilitar la separación de las proteínas en la cromatografía (37), también se analiza este sobrenadante por medio de CIEF, IEF, EGA y determinación de proteínas.

La muestra se coloca en la columna de cromatografía empacada con Ultrogel ACA 22 y se corre a un flujo de 15ml/hora, colectándose fracciones de 5.3ml, las fracciones positivas a AgsHB se unen y se concentran con PEG 20,000.

La preparación concentrada se analiza por medio de CIEF, IEF y EGA.

RESULTADOS.

Se trabajó con dos diferentes sueros AqsHB positivos, una vez que se confirmó la presencia del antígeno los sueros fueron tratados como sigue:

Se tomaron 10ml de cada suero y se dializaron contra dos cambios de un litro de SSA para equilibrar el pH a 7.2 , después de la diálisis se determino la concentración de proteínas a cada suero dando como resultado lo siguiente:

Suero 1 (S1) 65.16mg/ml      Suero 2 (S2) 69.1mg/ml.

El título de cada suero se determinó por CIEF siendo para S1 de 1/16 y para S2 1/32.

Precipitación con PEG, a cada 10ml de suero se añadieron 1.65ml de una solución de PEG al 40%, lo suficiente para alcanzar una concentración de PEG de 5.5% en la muestra ( toda la operación se llevo acabo en tubos cónicos de centrifuga de 15ml de capacidad) después de la adición de PEG los tubos se taparon con parafilm y se agitaron suavemente para homogenizar la formación de precipitado, después de lo cual se mantuvieron en refrigeración por dos horas.

Después de lo anterior el precipitado formado se sedimentó centrifugando los tubos a 4,550xg por 15 minutos a temperatura ambiente. Se se separo el precipitado y el sobrenadante, resuspendiendo el primero en 5ml de SSA, tanto los precipitados como los sobrenadantes obtenidos se colocaron en bolsas de diálisis

y se dializaron contra dos cambios de un litro de SSA, después de lo cual se les determinó proteínas y título por CIEF, los resultados se esquematizan en el cuadro siguiente.

MUESTRA	S1	S2
Proteína sobrenadante	42.9mg/ml	48.16mg/ml
% de proteína	75.1%	77.70%
Proteína precipitado	29.06mg/ml	30.22mg/ml
% de proteína	23.3%	21.86mg/ml
Título sobrenadante	1/16	1/32
Título precipitado	1/2	1/4

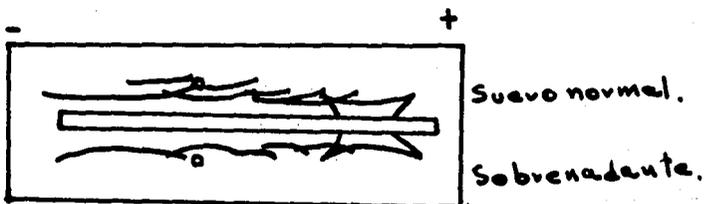
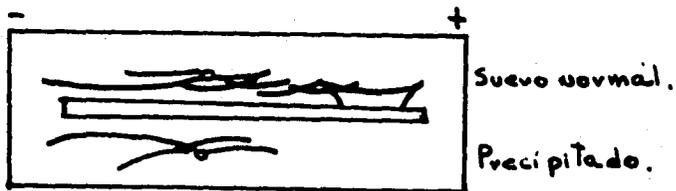
El aspecto del suero cambia considerablemente al momento de la precipitación tornándose amarillento, después de la centrifugación el sobrenadante queda de un color amarillo claro y se pierde por completo la opalescencia que presenta el suero completo el precipitado queda de un aspecto lechoso fácilmente resuspendible en SSA y con un aumento considerable de su viscosidad la cual se pierde después de la dialisis, aunque el aspecto lechoso se mantiene.

## ANALISIS INMUNOELECTROFORETICO DE PRECIPITADOS Y SOBRENADANTES.

Los resultados proporcionados por la IEF con cada una de las muestras trabajadas concuerda con la hipotesis de Laurents(40,41) pues resulta claro que las proteinas de alto peso molecular del suero precipitan primero cuando este es tratado con PEG al 5.5%. Los patrones inmunolectroforeticos obtenidos para cada precipitado muestran principalmente bandas que corresponden a las proteinas de alto peso molecular como lo son las beta lipo-proteinas, IgM y alfa 2 macroglobulina además de IgG y otras proteinas de bajo peso molecular, Los resultados fueron iguales para los dos sueros usados.

Por otro lado el porcentaje de AgsHB que precipita es sumamente bajo y no afecta en gran manera al rendimiento final ya que como se verá más adelante la pérdida por desnaturalización es mayor.

Ver dibujo 1



dibujo 1.

El patron inmunolectroforetico de los sobrenadantes carece por completo de la banda correspondiente a las beta lipoproteinas además de que la banda de IgM decrece notablemente en intensidad sin embargo se observa que la banda correspondiente a la alfa 2 macroglobulina casi no cambia con relación al suero completo, sin embargo esto no interfiere en el segundo paso de purificación pues su peso molecular cae dentro del rango de fraccionamiento del gel usado lo mismo que la pequeña proporción de IgM que permanece en el sobrenadante.

El factor de purificación que se obtiene en este primer paso concuerda en cierta manera con lo descrito por Vnek (31), el cual es de 1.23 y además el título del sobrenadante se mantiene igual al del suero lo que indica que no hay pérdida o desnaturalización importantes de AgsHB en este primer paso del procedimiento.

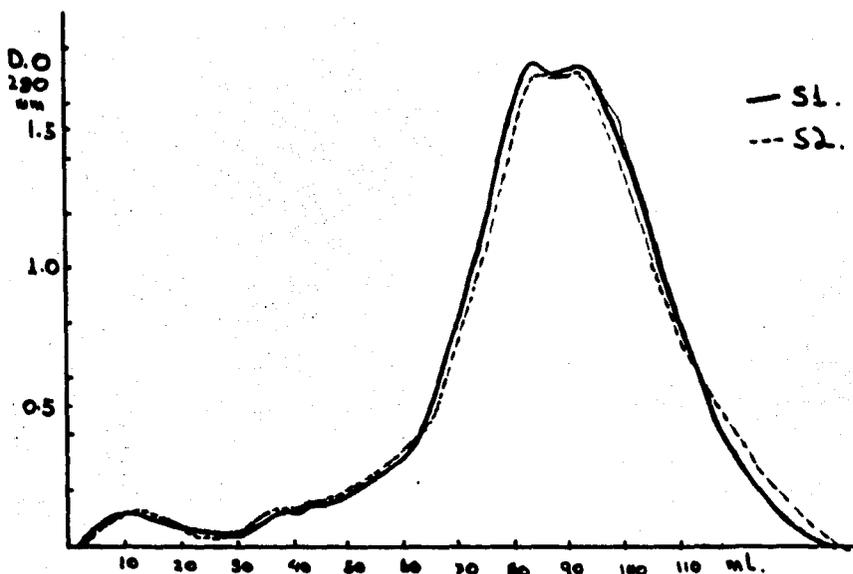
#### ELECTROFORESIS EN GEL DE ACRILAMIDA.

La electroforesis en gel de acrilamida presenta los mismos resultados que la inmunolectroforesis, demostrándose la eliminación de las beta lipoproteinas en el sobrenadante, además por esta técnica se pudo demostrar que la proporción de alfa 2 macroglobulina es mucho mayor en el precipitado que en el sobrenadante.

## CROMATOGRAFIA EN GEL.

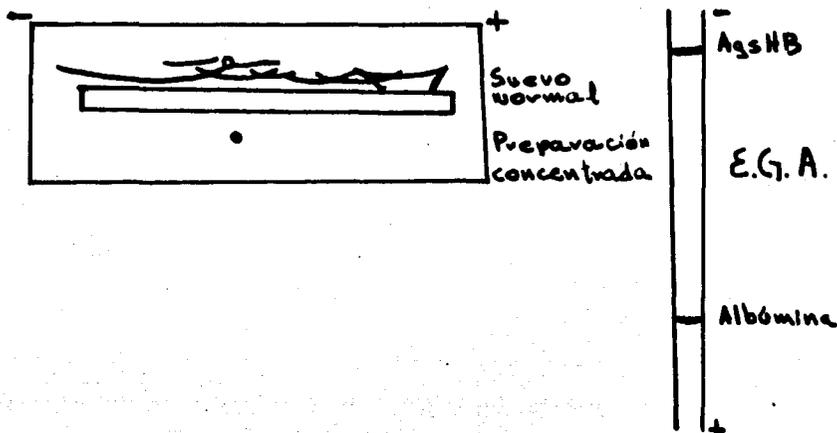
Se siguió el procedimiento descrito anteriormente, el volumen de la muestra colocada en cada corrida fué de 11.4 y 11.5ml para S1 y S2 respectivamente (sobrenadantes), las condiciones fueron: flujo 15ml/hora, fracción 5ml a temperatura ambiente.

El dibujo siguiente muestra las graficas obtenidas para cada una de las muestras, la parte sombreada representa el AgsHB.



Como se puede apreciar en las graficas hay una buena resolución de los componentes del sobrenadante. La posición del AgsHB es la esperada y no se encontro AgsHB en ninguna de las demas fracciones lo que indica que su estructura se mantuvo, el resultado concuerda con la hipótesis hecha pues el AgsHB supera el rango de fraccionamiento del gel pues su peso molecular es de  $3 \times 10^6$ .

Las fracciones positivas a AgsHB se juntaron haciendo un volumen aproximado de 35ml el cual se concentro con PEG 20,000. hasta 1.9ml y 1.6 para S1 y S2 respectivamente. Por medio de IEF no fué posible detectar proteínas séricas humanas en las preparaciones concentradas los resultados se esquematizan en el dibujo siguiente.



Por medio de la electroforesis en gel de acrilamida se detectaron solamente trazas de albúmina, esto fue posible solo después de concentrar la muestra más de 50 veces, estos datos concuerdan por los reportados por F. Barin (33), los resultados fueron iguales para los dos sueros.

En la tabla 5 se presentan los resultados generales obtenidos en este trabajo.

RESULTADOS TABLA 5.

MUESTRA	CIEF	PROTEINA %	mg/ml	VOL.	ACTIVIDAD ESPECIFICA	FACTOR DE PURIFICACION	RENDIMIENTO
S1	1/16	106	54.3	12	0.184	- -	100
Sobrenadante precipitación PEG 0.5%	1/16	75.1	42.9	11.4	0.372	2.02	95.0
Precipitador Precipitación PEG	1/2	22.3	29.06	5	0.08	0.364	5.20
Pool Columna	1/32	0.29	0.99	1.9	32.34	351.32	31.6
S2	1/32	100	59.33	11.65	0.539	- -	100
Sobrenadante precipitación PEG 5.5%	1/32	77.70	48.16	11.15	0.664	1.23	95.70
Precipitado Precipitación PEG	1/4	21.56	30.22	5.0	0.132	0.244	5.36
Pool Columna	1/128	0.31	1.34	1.6	98.87	179.72	54.93

Actividad Especifica =  $1/2$  vol. muestra/ total mg de protefna.

Factor de purificación = Actividad Especifica muestra/ac especifica suero,

Rendimiento =  $(1/x \text{ vol. muestra} / 1/X \text{ vol. suero}) \times 100$

$1/x =$  Titulo CIEF.

## CONCLUSIONES.

No obstante los avances en el conocimiento de la hepatitis B, de ninguna manera se puede decir que se halla llegado a un nivel de conocimientos mediante los cuales se pueda ejercer un control efectivo sobre la enfermedad, sin embargo, se ha logrado disminuir significativamente su incidencia, principalmente en lo que respecta a hepatitis B postransfucional. Ultimamente se ha desarrollado una vacuna (33) contra la hepatitis B lo que representa un significativo logro en lo que toca a su prevención, pero estas no se encuentran disponibles en las cantidades necesarias para su utilización en masa, principalmente debido a problemas metodológicos. El problema metodológico se refiere a la necesidad de un método de purificación que no sea tan sofisticado en su desarrollo y que no requiera equipo costoso y especializado, como es el caso de algunos métodos mencionados en el capítulo 4. Por otro lado no ha sido posible obtener preparaciones completamente puras de AgsHB, o sea sin proteínas plasmáticas contaminantes, lo que resulta indispensable para producir vacunas y realizar estudios básicos sobre el virus. Las técnicas de purificación que han dado mejores resultados han sido las de precipitación y cromatografía en gel. La metodología que se usó en este trabajo permite una rápida y satisfactoria recuperación de AgsHB a partir de donadores aparentemente sanos. La principal característica del método es la de eliminar en el primer paso los constituyentes séricos que usualmente se encuentran en las preparaciones purificadas de de AgsHB, en particular las betalipoproteínas, IgM y alfa 2 macroglobulina, estas dos

Últimas son eliminadas completamente en la segunda fase del método descrito, y que corresponde a la cromatografía en gel.

La recuperación de AgsHB fue hasta de un 54% que en comparación con los métodos de centrifugación y cromatografía de afinidad resulta ventajosa. Además de que el equipo y material requeridos no fueron un factor limitante y por lo mismo el método es susceptible de aplicación a gran escala.

La pureza del material obtenido es comparable con la reportada para métodos semejantes (afinidad y centrifugación) (33) pues se detectan contaminantes en mínima proporción (albumina) y solo después de que la preparación final se concentro más de 50 veces

El principal objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un método practico para la purificación de AgsHB, ya sea para su uso en el desarrollo de técnicas de detección, las cuales vayan más de acuerdo con las posibilidades técnicas y económicas de cualquier laboratorio clínico, con el mínimo de equipo, como lo como lo son en general en nuestro medio.

Por otro lado el método descrito para la purificación del AgsHB tiene la posibilidad de ser utilizado para la producción de una vacuna contra la hepatitis viral tipo B, para lo cual se tienen que realizar estudios más completos sobre la composición de las preparaciones obtenidas en lo que respecta a su contenido de partículas de Dane o sea el virus completo, lo que daría la pauta para su utilización del método con ese fin.

En cuanto a la importancia de la hepatitis B en México basta citar que la cirrosis hepática es la cuarta causa de internamiento hospitalario, de este grupo el 12% es consecutiva a hepatitis viral ( tanto A,B y no A-no B) de estas el 50% es postransfucional por hepatitis B (46) lo que nos da una idea de la necesidad de desarrollar técnicas sensibles, económicas y sencillas para la detección de AgsHB, mediante las cuales se podría aquilatar mejor el problema de la hepatitis viral en México.

BIBLIOGRAFIA.

1. "The Mystery of Australian Antigen". Anthony Waterson  
New Scientist. Nov. 1976. Pag. 470-471.
2. "Hepatitis, Modern Clinical Concepts."  
Continuing Education in Medicine.  
C.L. Gitnick, M. D.
3. "A Serum Antigen (Australia Antigen) in down's Syndrome,  
Leukemia and Hepatitis".  
B.S. Blumberg.  
Annals of Internal Medicine. Vol. 66 Pag. 924-931 1967.
4. "An Antigen Detected in Blood during Incubation Period of  
Serum Hepatitis".  
Alfred Prince.  
Proceedings of the National Academy of Sciences. Vol. 60  
Pag. 814-821. 1968.
5. "The Discovery of Antigen Australia and it's relation to  
viral Hepatitis".  
Blumber B.S. A.I. Sutnik, W.T. Lander, and I. Millman.  
Perspect Virol. 7 - 223-240 1971.
6. "Hepatitis Virus.  
F, Blaine Hollinger  
Manual of Clinical Microbiology, Second Edition, Pag.  
819-833.

7. "Recent advances in the Identification of Hepatitis Viruses".  
Jelus M. Dustag. R.H. Purcell.  
Postgraduate Medical Journal 53: 364-373. 1976.
8. "Diagnostico Clínico y Tratamiento".  
Marcus A. Krupp. Milton J. Chatton.  
Pag, 423-426 Ed. El Manual Moderno.
9. "Progresos en el estudio de la Hepatitis Virica".  
Informe del Comité de expertos de la O.M.S. en Hepatitis  
Virica. Serie de informes técnicos 602. Pag. 8-9 1977.  
Organización Mundial de la Salud Ginebra Suiza.
10. "Detección del Antígeno Soluble de la Hepatitis B por Diferen  
tes Métodos".  
Tesis Profesional. Maria Teresa García.  
Facultad de Química, UNAM 1978.
11. "Biophysical and Biochemical properties of the Purified Pre-  
paration of Hepatitis B surface antigen (HBsAG).  
G.R. Dressman F.B. Hollonger J.L. Melwick.  
AM. J. Med, SCI 270: 123-129 1975.
12. "Thermal Inactivation of Hepatitis B surface Antigen".  
Silvo de Flora.  
Journal of Immunology, 120: 40-45 1978.
13. "New Antigen Antibody System in Australia Antigen Positive  
Serum".  
J.D. Almeida, D, Rubenstein, E.J. Stott.  
The Lancet, 1971 ii 1225-1227.

14. "Biochemical Characterization of Australia Antigen".  
J.L. Gering. E.C. Ford. R.H. Purcell.  
AM. J. of Patol 81: 651-661 1976.
15. "Dane Particles, Dnapolimerasa and Antigen in two Different Categories of Hepatitis B Antigen, Carriers.  
E. Nordenfolt L. Kjellen  
Intervirol. 5: 225-232. 1975.
16. "Radioimmunoassay for the Detection of Hepatitis e Antigen and Antibody".  
H.A. Fields. D.W. Bradley C.L. Davis. B.L. Morphy  
J. of Immunol. 121: 930-934 . 1978.
17. "New Especificities in Australia Antigen Positive sera Distinct from Le Baovier Determinants".  
Manius L. O. J.A. Espmark.  
J. Immunol. 109: 1017- 1972.
18. "Purification and Partial Characterization of Hepetitis e Antigen.  
Infect, Immunol. 20: 729. 1978.
19. "Host Especificidity of a Serum Marker for Hepatitis B Evidence that a Antigen has the Propieties of an Immunoglobulin".  
Neurath A.R. H. Strick.  
Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 1702. 1977.
20. "Hepetitis B e Antigen, In Apparent Association with Lactate Dehydrogenase Isoenzume 5.  
Vyas G.N. D.L. Peterson.  
Science 198: 1068, 1977.

21. "Le Bauvier G.L." Williams A.  
Am J. Med. Sci. 270: 165- 1975.
22. "Immunochemistry of Hepatitis B surface antigen (ABsAG)  
Preparation and Characterization of Antibodies to The -  
Constituent Polypeptides.  
J. Wai-Kuo Shih. J.L. Gerin.  
J. of Immunol. 115: 634-639 1975.
23. "Antigenicity of the Mayo Polypeptides of Hepatitis B  
Surface Antigen".  
J. Wai-Kuo Shih. P.L. Tam. J.L. Gerin.  
J. of Immunol. 120: 520-525 1978.
24. "J. Virol 7: 569 1971  
Gerin J. L. Holland P.V. and Purcell R.H.
25. "Isolation of Hepatitis B Surface Antigen (HBsAG) by Affi-  
nity Chromatography on Antibody Coated Immunosorbents".  
B. Houwen. A. Goudeau. and J. Dankert.  
J. of Immunol Meth 8: 185-194 1975.
26. "Grabow, W.O.K. and O.W. Prozesky  
J. Infect, Dis. 127 183 1973.
27. "Jozwiak, W. and J. Koscielack.  
J. Immunol 110, 1151. 1973.
28. "Affinity Chromatography of Hepatitis B Antigen on Concina-  
valin a Linked to Shepharose.  
A.R. Neurath. A.M. Prince.  
J. Gen. Virol 19: 391-395 1973.

29. "Cawley L.P.  
Reaction Between Concanavalina and the Ausrealia Antigen".  
American Journal of Clinical Pathology 57: 253 1973.
30. "Purification of Hepatitis B Surface Antigen by Affinity  
Chromatography".  
Monica Einarsson  
Vox Sanguinis 35: 224-233 1978.
31. "Large Scale Purification of Hepatitis B Surface Antigen".  
J. Vnek, A.M. Prince.  
J. Clin. Microbiol. 3: 626-631 1976.
32. "Methodologie Simple de Separation et de Purification de  
L'Antigene de Surface de L'Hepatitis B a Partir du Serum".  
G, Desmet et J.L. Biteux.  
Clinica Chimica Acta 74: 59-69 1977.
33. "Large Scale Purification of Hepatitis B Surface Antigen".  
F. Barin. M. Andre, A. Coudeau. P. Coursagentand. P. Maupas.  
Ann Microbiol. (Inst. Pasteur) 129b: 87-100. 1978.
34. "A. Polson, G.M. Pogieter, J.F. Largier, F.J. Joubert.  
Biochim, Biophys, Acta. 82: 459. 1964.
35. "Australia Antigen "ad" and "ay" Subtypes, Purification and  
Partial Characterization".  
R. Bourbonnais, R.M. Guevin and E.F. Delvin.  
Vox Sang. 29: 269-279 1975.

36. "Instruction Mannual LkB Ultrogel".  
LKB Producter A.B.  
161. 25 Bromma, Sweden.
37. "Precipitation of Human Serum Proteins by Polyethyleneglycol".  
B. Chesebro, S.E. Suettag.  
Clin. Chim Acta. 20: 527-529 1968
38. "Polson A".  
Biochim. Biophys Acta. 82: 463- 1964
39. "M. Zeppeza Ver, S. Brishamer.  
Biochim Biophys Acta. 133: 371 1967.
40. "T. Laurent"  
Biochem Journal 89: 253- 1963.
41. "T. Laurent".  
Acta Chem Scand. 17: 2664 1963.
42. "Manual of Clinical Immunology".  
Rose and Friedman.  
American Society for Microbiology. Pag. 21.
43. "Biochemystry"  
A. Lehninger.  
Pag. 159-160 Worth Publishers Inc. 1972.
44. "Lowry T."  
Analitical Bichemistry 48: 422-427 1972.
45. "Methods in Immunology Second Edition".  
Campell D.H.  
Pag. 261  
W.A. Benjamin Inc.

46. "Comunicación Personal Sección de Gastroenterología".  
Centro Hospitalario 20 de Noviembre ISSSTE.