

7
24'



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

ESTUDIO COMPARATIVO DE MARCADORES SEROLOGICOS DE HEPATITIS B EN POBLACION SANA (DONADORES) Y PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS.

T E S I S
Para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a

MARTHA PATRICIA CRUZ TAPIA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1 9 9 1





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 está 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

- CAPITULO 1.- INTRODUCCION
- 1.1 .- Antecedentes Históricos
 - 1.2 .- Hepatitis Viral
 - 1.3 .- Propiedades Fisicoquímicas del Virus de la Hepatitis B
- CAPITULO 2.- FUNDAMENTACION DEL TEMA
- CAPITULO 3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA
- CAPITULO 4.- OBJETIVOS
- CAPITULO 5.- HIPOTESIS
- CAPITULO 6.- MATERIAL Y METODOS
- 6.1 .- Material Biológico
 - 6.2 .- Material de Laboratorio
 - 6.3 .- Aparatos de Laboratorio
 - 6.4 .- Reactivos
 - 6.5 .- Diagrama de Flujo
 - 6.6 .- Métodos
 - 6.6.1 .- Procedimiento para determinar AgHBe por - ELISA
 - 6.6.2 .- Procedimiento para determinar Anti-HBe - por ELISA
 - 6.6.3 .- Procedimiento para determinar Anti-HBe - por ELISA
 - 6.7 .- Métodos Estadísticos
 - 6.7.1 .- Validez de las determinaciones por ELISA
 - 6.7.2 .- Análisis de frecuencias e histogramas para determinar los marcadores serológicos de hepatitis B más frecuentes en población sana (donadora) y pacientes poli - transfundidos.

- 6.7.3 .- Regresión Múltiple
- 6.7.4 .- Análisis de Varianza
- 6.7.5 .- Prueba Chi-Cuadrada de independencia-tablas de contingencia

CAPITULO 7.- RESULTADOS

- 7.1 .- Comprobación de la validez en las determinaciones de ELISA
- 7.2 .- Análisis de frecuencias e histogramas para determinar los marcadores serológicos de hepatitis B más frecuente en población donadora y pacientes politransfundidos.
- 7.3 .- Regresión múltiple y ANADEVIA
- 7.4 .- Prueba Chi-Cuadrada de independencia-tablas de contingencia para AgHBs, Anti-HBc y Anti-HBs en donadores y pacientes politransfundidos.
- 7.5 .- Relación de marcadores serológicos de hepatitis B con importancia clínica, determinando si se trata de una infección aguda, estado de transmisión o convalecencia.

CAPITULO 8.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

CAPITULO 9.- CONCLUSIONES

CAPITULO 10.- BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCION

1.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

Antes de 1942 a la hepatitis infecciosa por virus se le llamaba ictericia catarral, padecimiento mal definido, cuya naturaleza infecciosa no estaba bien precisada y que parecía tener escasa importancia epidemiológica en la población civil.

En 1961 hubo, en los Estados Unidos, más de 72 000 casos de hepatitis por virus. Esta había sido la más alta frecuencia observada desde 1952, época en la que comenzaron a hacerse comunicaciones científicas de dicha enfermedad.

En 1962 se reconoce que es una de las enfermedades por virus más frecuentes y que, en todo el mundo, actúa en forma endémica o epidémica a hombres, mujeres, niños y ancianos; y se sabe que en cierto número de casos, reducido por fortuna, puede causar lesiones crónicas y graves al hígado. (1)

Ha pasado algo más de dos décadas desde que el Dr. Baruch J. Blumberg descubrió un antígeno en la sangre de un aborigen australiano que reaccionó con el suero de un paciente con hemofilia, al principio se creyó estaba asociado a la leucemia aguda. Pronto se comprobó que este antígeno estaba presente con alta frecuencia en el suero de pacientes con hepatitis, y muy poco después la detección del así llamado "antígeno australiano" era ya un procedimiento establecido para la detección de hepatitis, en particular hepatitis sérica. Desde entonces se ha producido un enorme aumento de los conocimientos sobre hepatitis vírica que procede principalmente de este descubrimiento científico básico.

En los años setentas por medio de microscopía electrónica e inmunofluorescencia se demostró la morfología de los ví

rus de hepatitis A y hepatitis B. (2)

Actualmente se sabe que una cantidad de distintos agentes víricos puede causar una hepatitis aguda, bien como infección aislada o formando parte de una enfermedad sistémica. Entre éstas se encuentran el virus de Epstein-Barr, el citomegalovirus, adenovirus, enterovirus y la fiebre amarilla, así como algunos otros. Sin embargo, la mayoría de los casos de hepatitis son debidos a tres agentes distintos, se trata del virus de la hepatitis A, de la hepatitis B y un tercer estadio llamado de la hepatitis no A no B, que en realidad puede representar dos o más agentes diferentes. Recientemente se ha descrito otro agente, el agente delta. Se considera que éste es un virus RNA pequeño y defectuoso, que sólo replica en presencia de infección por el virus B de la hepatitis y que se ha detectado sobre todo en drogadictos y hemofílicos con hepatitis crónica B. (3)

Los métodos de prueba para la presencia del virus de hepatitis B han conocido un gran desarrollo tecnológico durante los últimos 20 años. Como casi todos ellos se usaron originalmente para la detección de antígeno superficial de hepatitis B, la evolución de dichos métodos se refiere en términos de prueba de hepatitis B.

Desde que el "antígeno australiano" se descubrió por el método de difusión en gel de agar, los métodos se han hecho cada vez más sensibles hasta llegar a la clasificación de procedimientos en pruebas de primera, segunda y tercera generación. El método de difusión en gel es el de primera generación y es la norma de sensibilidad. Al avanzar la tecnología se conocieron pruebas de segunda generación que dieron un aumento de 5 a 20 veces de sensibilidad. Los métodos más comunes de esta generación son contrainmunolectroforesis y

fijación del complemento. Como la sensibilidad seguía siendo poco satisfactoria, pues se estimaba que el uso de métodos de segunda generación detectaban menos del 25% de unidades potencialmente infecciosas, se desarrollaron pruebas de tercera generación que ofrecieron 2 a 10 000 veces el aumento de sensibilidad en comparación con la difusión en gel de agar. Los procedimientos que pueden considerarse hoy de tercera generación son el radioinmunoanálisis, ELISA: (inmunoensayo ligado a enzimas) y la hemaglutinación reversa pasiva.

(2)

Además la hepatitis puede ser de etiología no infecciosa, tal es el caso de drogas, alcohol, anestesia y otros inhalantes.(5) Ha ido en aumento el reconocimiento de que el diagnóstico específico etiológico en los distintos casos tiene implicaciones importantes, tanto en lo que se refiere al tratamiento del paciente como al control epidémico.(3)

1.2. HEPATITIS VIRAL

La hepatitis aguda es una inflamación difusa del hígado ocasionada por la acción de agentes infecciosos o de algunas sustancias con potencial hepatotóxico. Las causas más frecuentes son las infecciones por virus. El curso de la hepatitis aguda es extremadamente variable. Esta enfermedad puede ser moderada, transitoria, y completamente asintomática, severa, prolongada y finalmente fatal. (6)

Los virus de hepatitis tipo A y tipo B han sido identificados y bien caracterizados.

El curso de la hepatitis viral aguda es separada en cuatro periodos: período de incubación, fase preictérica, fase ictérica y convalecencia.

El período de incubación de la hepatitis viral aguda representa el tiempo entre la exposición y el primer día de síntomas, dicho período puede variar desde días hasta meses. El período de incubación de la hepatitis tipo A es de 25 - 45 días (rango 15-45 días), para la hepatitis B es de 75 días - 180 días (rango 40-180 días), y para la hepatitis no A no B cerca de 50 días (rango 15-150 días).

La fase preictérica representa el período de síntomas - no específicos antes de que la ictericia de principio o aparezca orina oscura. Dentro de los síntomas iniciales se encuentran: malestar, susceptibilidad a la fatiga, anorexia, vómito y náusea, dolor en el cuadrante superior derecho, fiebre, prurito y artralgia.

La fase ictérica se caracteriza por la aparición de orina oscura e ictericia, el tiempo de duración de esta fase varía, pero generalmente el paciente llega a sentirse mejor una o dos semanas de iniciada la ictericia.

La fase de convalecencia de hepatitis viral llega con la desaparición de la ictericia y mejoría de los síntomas.(7)

El diagnóstico clínico de la hepatitis vírica no suele ser difícil y se basa en la elevación de las enzimas SGOT o SGPT y de la bilirrubina, en un aumento moderado de la fosfatasa alcalina y una prolongación variable del tiempo de protrombina. Una vez descartadas las causas tóxicas, metabólicas, obstructivas y bacterianas, se suele estar en disposición de limitar las posibilidades hacia una etiología vírica-determinada.(3)

El virus de la hepatitis A se transmite por vía fecal-oral y es excepcional su transmisión parenteral. Por ello, la hepatitis A aparece en forma de brotes epidémicos, debido a la contaminación de agua o alimentos con materias fecales infectadas, o en forma esporádica, por contacto de persona a persona. No existen portadores crónicos de este virus, por lo que el reservorio de la enfermedad lo constituyen los sujetos con enfermedad aguda aparente o inaparente. La hepatitis tipo A tiene un período de incubación corto y da lugar a la producción por el organismo de anticuerpos específicos que confieren inmunidad.(6)

La hepatitis tipo B se difunde principalmente por la ruta parenteral y ha sido asociada con la transfusión sanguínea o de productos sanguíneos. Estudios experimentales han demostrado que el virus no es infeccioso por vía oral, nasal o respiratoria. Algunos casos de contagio no parenteral comprenden relaciones íntimas o sexuales con individuos infectados. La enfermedad es muy común en homosexuales y grupos de alta promiscuidad, así como en pacientes que requieren continuamente de transfusiones sanguíneas.(7)

El período de incubación de la hepatitis B correlaciona-inversamente con la dosis del virus: a mayores dosis el período de incubación es corto.

El primer marcador serológico que aparece es el antígeno de superficie (AgHBs), el cual puede ser detectado en suero - durante el período de incubación, se localiza de 2-6 semanas antes de la evidencia clínica y bioquímica de la hepatitis y persiste durante toda la evolución clínica del padecimiento, - pero en forma típica aparece seis meses después de la exposición del contagio. En las personas destinadas a convertirse en portadores, la enfermedad inicial puede ser leve o inaparente, manifestada sólo por un valor elevado de las transaminasas.(8) El AgHBs se ha identificado en las formas esféricas y tubulares en la célula hepática y en la sangre circulante de pacientes con hepatitis. Este es el antígeno para el que deben hacerse pruebas en todas las unidades de sangre donada.(2) La mayoría (más del 70%) de los donantes aparentemente normales en los que se detecta positividad para el AgHBs tienen una función hepática normal, mientras que Reesin y cols. (1980) encuentran que el 30% de los casos presentan - sus pruebas hepáticas funcionales alteradas.(4)

Algunas evidencias serológicas han propuesto a marcadores serológicos sensibles a la activa replicación del virus de la hepatitis B. Dentro de estos marcadores se encuentra - el AgHBe, antígeno que parece tener una relación más estrecha con el centro que con la superficie de la partícula virósica. La presencia de este marcador correlaciona muy bien con los altos niveles del virus de la hepatitis B en suero y por lo tanto altos grados de infectividad. Sin embargo AgHBe no está presente en el suero de todos los pacientes que continúan

produciendo partículas del virus de la hepatitis B.(9) Casi al mismo tiempo que aparece AgHBs, se hace detectable también el AgHBe, sin embargo éste último persiste por un período más corto que el AgHBs en la mayoría de pacientes.(7) La ausencia de AgHBe es seguida por la aparición del anticuerpo al AgHBe (anti-HBe), esta seroconversión ocurre generalmente durante la mayor actividad de la enfermedad pero esto puede sugerir que la infección y la enfermedad están por desaparecer. Aunque en personas que evolucionan de una hepatitis aguda a una crónica, es decir, que son portadores crónicos de AgHBe, la seroconversión de AgHBe a anti-HBe no ocurre en la fase aguda de la enfermedad. Así la desaparición de AgHBe puede ser interpretada como probable recuperación, así como la desaparición de AgHBs.(7)

Otros investigadores han sugerido que el DNA del virus de la hepatitis B, así como la DNA-polimerasa pueden ser marcadores más directos y quizá más sensibles de la producción del virus.(9) La DNA-polimerasa en el suero indica replicación viral continua, pero esta enzima no es incluida en la evaluación rutinaria, porque el sistema de prueba es variable y los resultados no ayudan substancialmente a la evaluación de la enfermedad. Sin embargo, determinaciones seriadas de DNA-polimerasa son el indicador más sensible de los efectos terapéuticos de la hepatitis crónica con interferón o bien con quimioterapia.(10)

El antígeno central AgHBc no ha sido demostrado en el suero de víctimas de hepatitis de donadores sanguíneos. Generalmente solo se ve en los núcleos de hepatocitos durante la infección aguda por hepatitis B.(2)

El anticuerpo central de la hepatitis B (anti-HBc), se -

hace detectable durante la última parte de la fase aguda, alcanza un alto título al final de esta fase y persiste durante toda la convalecencia y probablemente por toda la vida, aunque eventualmente podría declinar, por tanto denota una infección aguda, estado de transmisión o convalecencia temprana. - En cambio, en los sueros de la mayoría de los portadores crónicos de AgHBs se encuentran títulos bajos de anti-HBc IgM. - (5) Según un estudio realizado por Hoofnagle y cols., en 1985 indica que la mayoría de pacientes con hepatitis B crónica continua la producción detectable de anticuerpo IgM contra el componente core del virus de la hepatitis B. Este anticuerpo fué encontrado en el 99% de pacientes que tuvieron AgHBs detectable en suero, así como en los pacientes que resultaron seronegativos para el AgHBs pero quienes, sin embargo, parecían tener una continua hepatitis tipo B. Estos hallazgos sugirieron que la presencia continua de el antígeno core de la hepatitis tipo B induce a una continua producción de anticuerpo específico de la clase IgM. (9)

Quizá el 5% de los casos agudos de hepatitis B, y con más frecuencia durante la convalecencia inmediata, el AgHBs puede no ser localizable en el suero. El exámen de estos sueros en busca de títulos altos de anti-HBc IgM específica puede ayudar a establecer el diagnóstico correcto. Existen algunos casos donde el anti-HBc puede aparecer tanto en ausencia de AgHBs como de anti-HBs, tal período es llamado "período de ventana", y es considerado potencialmente infeccioso. (7) De aquí que aún cuando sangre AgHBs negativa de donadores voluntarios es empleada, la hepatitis postransfusional tipo B ocurre en aproximadamente 8-10% de los receptores. (13)

En un estudio realizado en 1964 (20) en Estados Unidos -

se observó que anti-HBc tuvo una frecuencia muy alta (80%) en hombres homosexuales quienes tienen un alto riesgo de contraer infección por el virus del SIDA. Así en Mayo también de 1984 se introduce anti-HBc como prueba de rutina para descartar donadores sanguíneos potencialmente infecciosos en la ciudad de San Francisco. (21)

Los anticuerpos anti-HBs aparecen en la mayoría de las personas que se restablecen de hepatitis por el virus B. Los pacientes politransfundidos, como los hemofílicos, presentan una frecuencia muy alta de anti-HBs. Anti-HBs es probablemente el mejor anticuerpo protector en esta enfermedad. (4)

La llamada hepatitis no A no B representa el 90% de los casos de hepatitis postransfusional y se diagnostica por exclusión de marcadores serológicos tanto para el virus de la hepatitis A como para el virus de la hepatitis B. (14) Desde 1974 se sospechó de un tipo de infección no relacionado al virus de hepatitis A, hepatitis B y citomegalovirus, pero que sin embargo provocaba hepatitis postransfusional con un período de incubación largo, surgiendo la necesidad de identificar al virus de la hepatitis tipo C. (17) No se habla ya de hepatitis C, puesto que se ha comprobado que hay más de un tipo de virus no A no B y porque además, hasta el momento no se ha demostrado especificidad en las pruebas. La forma de transmisión de la hepatitis no A no B puede ser similar, a veces a la de la hepatitis B. Es más frecuente tras la transfusión u otra exposición percutánea; es más común en las poblaciones de bajo nivel socioeconómico, probablemente se contagia por contacto estrecho de persona a persona y se asocia con un estado de portador crónico. (4) Los hallazgos bioquímicos son similares que en la hepatitis A y hepatitis tipo B; tal como elevaciones considerables de bilirrubina y fosfatasa alcalina (12). Si se practica una biopsia hepática, en la mayoría de-

los casos se observan signos histológicos sugestivos de hepatopatía crónica significativa, con características de cirrosis en aproximadamente un 10% de ellos. (4) Estudios recientes han demostrado que el virus de la hepatitis B fué integrado dentro del DNA hepatocelular en algunos pacientes con hepatitis crónica no A no B. También se ha visto que el riesgo de hepatitis postransfusional no A no B está asociado con sangre anti-HBc positivo hasta en tres veces más alto que el encontrado con sangre anti-HBc negativo y que no correlaciona con los niveles elevados de transaminasas en sangre de donadores. (11)

1.3. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

La microscopía electrónica del suero con AgHBs ha revelado tres formas. Las más numerosas son las partículas esféricas que miden 22 nm de diámetro. Estas pequeñas partículas parecen estar integradas exclusivamente de AgHBs, al igual que las formas filamentosas o tubulares que tienen el mismo diámetro, pero pueden tener una longitud mayor de 200 nm. Las esferitas mayores de 42 nm de diámetro originalmente se denominaban partículas Dane y se observan con menor frecuencia. Estas partículas son más complejas. La superficie exterior de 27 nm de diámetro contiene AgHBc. La producción excesiva del componente de la superficie origina aparentemente las partículas de 22 nm. La actividad de polimerasa de DNA y un template endógeno de DNA están asociados con el centro inferior de la partícula Dane. El template de DNA consiste en DNA de tira doble con un peso molecular de aproximadamente 2×10^6 .

Dos polipéptidos mayores con pesos moleculares de 25,000 y 30,000 constituyen aproximadamente 55% del peso total de la partícula de 22 nm que contiene al AgHBs. Un tercer polipéptido mayor tiene un peso molecular de 68,000 y posee reactividad a AgHBs y da reacción cruzada con albúmina sérica humana. Puede ensamblarse la cápside viral a partir de 2 polipéptidos menores, uno de los cuales (PK 30,000) está glucosilado.

Las secuencias de nucleótidos que se encuentran en la región AgHBc del genoma del virus pueden codificar para este polipéptido, que tiene un PK de 15,000 a 20,000.

La estabilidad de AgHBs no siempre coincide con la del agente infectante. Sin embargo, ambos son estables a -20°C durante más de 20 años a la congelación y descongelación repetidas y a los procedimientos de fraccionamiento del plasma. El virus también es estable a 37°C por 60 minutos y se conserva viable después de ser desecado y almacenado a 25°C por una semana cuando menos. El virus (pero no el AgHBs) es sensible a temperaturas más altas (100°C por un minuto) o a periodos de exposición más prolongados (60°C por 10 horas); dependiendo de la masa de virus presente en la muestra. El AgHBs es estable a pH de 2.4 hasta durante 6 horas, pero se pierde la infectividad del virus. El hipoclorito de sodio a 0.5% destruye la antigenicidad en menos de tres minutos en soluciones con bajas concentraciones proteicas, pero las muestras no diluidas del suero requieren concentraciones mayores (5%). El AgHBs no es destruido por la irradiación ultravioleta del plasma o de otros productos sanguíneos y la infectividad viral puede también resistir tales tratamientos.(8)

2. FUNDAMENTACION DEL TEMA

La hepatitis vírica adquirida a través de un donante sigue siendo la complicación letal más frecuente de la transfusión de sangre. El descubrimiento de que era posible identificar la fase virémica de la hepatitis sérica (hepatitis B) - hizo abrigar la esperanza de llegar a detectar todos los donantes portadores y así eliminar el riesgo de hepatitis por transfusión. Aunque actualmente puede evitarse en gran medida la transmisión del virus de la hepatitis B, se ha observado que otros virus hasta el momento no caracterizados pueden producir también hepatitis postransfusional, la cual no podrá ser eliminada hasta que se realicen pruebas para la detección de los mismos.

Cantidades muy pequeñas de suero o plasma infectado, administradas por vía intravenosa o subcutánea, pueden transmitir el virus de la hepatitis B. La dosis infectante mínima de plasma de un portador fue estimada por Murray en 1×10^{-6} mililitros, mientras que Drake y cols., encontraron que 4×10^{-5} mililitros administrados en inyección subcutánea podían transmitir la enfermedad.(4)

La diseminación parenteral supone un riesgo mayor si se interpreta el término como la introducción percutánea a través de una barrera mucocutánea. Como tal puede ocurrir vía aguja, por la contaminación de instrumentos dentales, quirúrgicos o endoscópicos, o a través de los tatuajes o de equipo no estéril para perforar los lóbulos de las orejas, así como la costumbre de compartir las cuchillas de afeitar o los cepillos de dientes. (5,4) Todas las edades son susceptibles; se conoce la transmisión materna al feto o al recién nacido,-

la cual conduce con frecuencia a la infección crónica del lactante. Aunque se ha visto que casi todas las secreciones corporales son capaces de transmitir la hepatitis B (p. ej., saliva, orina, semen, sudor y calostro), parece que las fuentes de infección más peligrosas son la sangre y sus subproductos.

Dentro de los grupos de alto riesgo para contraer la infección encontramos a los individuos expuestos repetidamente a sangre o productos sanguíneos (cirujanos, dentistas, pacientes inmunosuprimidos, pacientes y personal de las unidades de hemodiálisis, hemofílicos), drogadictos y homosexuales. (3,19)

El virus puede ser detectado mediante pruebas sofisticadas de laboratorio; sin embargo, éstas no son todavía lo suficientemente sensibles como para detectar todos los donantes portadores del virus y como resultado, el tipo de hepatitis B puede todavía ser transmitido por medio de la transfusión. Debido a ello, aproximadamente un 10% de la hepatitis posttransfusional es del tipo B. (14) Por otro lado se considera que el 90% de las hepatitis posttransfusionales son no A no B, sólo que no hay pruebas de laboratorio específicas para detectarla y es posible que se trate de un grupo de virus y no de uno solo. (2,14) Mientras que la vía de contaminación de la hepatitis A es la entérica y raramente se transmite por transfusiones. (6)

Los productos sanguíneos capaces de transmitir hepatitis son: sangre completa, glóbulos rojos concentrados, plasma fresco congelado, plasma corriente, crioprecipitado y concentrado de factor VIII, fibrinógeno, complejo de protrombina, concentrado de plaquetas y de granulocitos. La gammaglobulina no ha sido implicada en la transmisión de hepatitis y la albúmina, así como la fracción de proteína plasmática, debido

a que el método de preparación no ofrece riesgos. Los glóbulos rojos congelados pueden transmitir hepatitis, pero la evidencia actual sugiere que el riesgo es mínimo comparado con los otros productos. Ello debido posiblemente a que con el extenso lavado de los glóbulos rojos durante el proceso de desglícerolización, se arrastra el virus. Los productos manufacturados con mezclas de plasmas tales como el fibrinógeno, son los que encierran el mayor riesgo de transmisión de hepatitis. (5, 18)

En los países donde es permitida la donación remunerada se ha demostrado que con la sangre proveniente de este tipo de donadores, el riesgo de hepatitis posttransfusional es mayor que con la proveniente de donadores voluntarios. Ello es debido a que entre los donadores profesionales abundan los alcohólicos y drogadictos. (5,15,16,22)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En un Banco de Sangre es de vital importancia realizar pruebas para descartar donadores potencialmente infecciosos a la hepatitis del tipo B, dichas pruebas comprenden la historia clínica y la prueba para determinación de AgHBs en suero de donadores. Para la presente investigación se consideró prudente realizar un estudio comparativo de marcadores serológicos de hepatitis B tanto en donadores como en pacientes politransfundidos, esto con el objeto de observar la incidencia de hepatitis en una población sana y en una de alto riesgo de contraer infección por el virus de la hepatitis tipo B. También se quiso demostrar la frecuencia del anticuerpo de core. Esto debido a que varios estudios aseguran que la presencia de dicho marcador sugiere replicación viral y por tanto infectividad. Con los tres marcadores serológicos usados en este trabajo (AgHBs, anti-HBc y anti-HBs), es posible determinar el estado de la infección y dar un probable pronóstico, además, claro está, descartar donadores de sangre potencialmente infecciosos, evitando el contagio de hepatitis postransfusional.

4. OBJETIVOS

- 4.1. Determinar la importancia del anti-HBc en un banco de sangre como un parámetro más para descartar donadores-potencialmente infecciosos de hepatitis tipo B, usando la técnica de ELISA.
- 4.2. Investigar la presencia de marcadores serológicos de hepatitis tipo B; AgHBs, anti-HBs y anti-HBc en población donadora que acude al banco de sangre del Centro-Médico la Raza, y en su caso determinar si se trata de una infección aguda, estado de transmisión o convalecencia.
- 4.3. Observar si existe alguna frecuencia relevante de dichos marcadores serológicos en dos poblaciones de donadores de la región norte y centro del D.F.

5. HIPOTESIS

- 5.1. La importancia de poder determinar anti-HBc en un banco de sangre radica en su aparición durante el período de ventana, es decir cuando las pruebas para AgHBs y anti-HBs son las únicas que se realizan, pueden pasar hasta tres meses entre la desaparición del primero y la aparición del segundo. Así, el diagnóstico de un paciente con infección actual o reciente puede pasarse por alto durante un período infeccioso. Como el anti-HBc, está presente en el período de ventana, es por tanto el indicador más útil de infección en ausencia de otros marcadores.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Grupo A: 100 sueros de pacientes de alto riesgo
- Grupo B: 200 sueros de donadores
- Controles positivos y negativos para la determinación de AgHBs, anti-HBc y anti-HBs respectivamente.

6.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- 300 tubos de vidrio 10x75 (Pyrex No. 9820)
 - 1 probeta (Pyrex) 50 ml
 - 1 probeta (Pyrex) 1000 ml
 - 10 pipetas graduadas 10 ml (IVA)
 - 5 pipetas graduadas 5 ml (IVA)
 - 5 pipetas graduadas 1 ml (IVA)
- 300 pipetas pasteur
- 1300 puntas nuevas, 2 pulgadas de polipropileno amarillo (Elkay) 2-200 ul
- 2 gradillas para 72 tubos
- 20 pares de guantes desechables
- 20 pares de guantes para cirujano (Protec)
- 3 frascos color ámbar 50 ml
- 20 batas sépticas
- 2 rollos de tela adhesiva
- 1 rollo de papel para fotocolorímetro
- 1 rollo de papel parafilm
- 200 gasas
- 1 perilla de succión

6.3. APARATOS DE LABORATORIO

Micropipeta (Clinipette) 50 ul
Micropipeta (Clinipette) 100 ul
Pineta múltiple para 12 puntas (Organon Teknika)
Centrífuga clínica (Internacional Modelo CS)
Lector fotométrico para microelisa (Organon Teknika)
Incubador a 37°C para microelisa (Organon Teknika)
Congelador (American Mo. 191734)
Filtro de 492 nm para fotocolorímetro
Filtro de 450 nm para fotocolorímetro

6.4. REACTIVOS

- Equipo para AgHBs por ELISA de Organon Teknika que contiene:

- 6 soportes, cada uno con 8 tiras Microelisa con 12 pocillos recubiertos con anti-HBs monoclonal (ratón) y contenidos en una bolsa que lleva un sobre de gel de sílice como agente desecante.
- 3 frascos, conteniendo cada uno 23 ml de conjugado - (anti-HBs marcado con el enzima peroxidasa de rábano picante, HRP), conservado con 0.1 g/l de mertiolato y 0.2 ml/l de cinamaldehído.
- 2 frasquitos de bioseguridad con 1.8 ml de control negativo cada uno (suero humano AgHBs negativo conservado con 0.1 g/l de sulfato de gentamicina y 0.2 ml/l de cinamaldehído).
- 2 frasquitos de bioseguridad con 1.8 ml de control positivo cada uno (suero humano con 1 U de AgHBs por ml del subtipo ad producido por una línea de células humanas, conservado con 0.1 g/l de sulfato de gentamicina y 0.2 ml/l de cinamaldehído).
- 2 frasquitos de bioseguridad con 1.8 ml de control positivo alto cada uno (suero humano con 10 U/ml de AgHBs del subtipo ad producido por una línea de células humanas, conservado con 0.1 g/l de sulfato de gentamicina y 0.2 ml/l de cinamaldehído).
- 1 botella con 100 ml de tampón fosfato concentrado, - que tiene que diluirse 25X antes del uso.
- 2 frascos conteniendo, cada uno, 20 tabletas de OFD - (dihidrocloruro de orto fenilendiamina) y una cápsula de gel de sílice como agente desecante.
- 2 sobres con una tableta de peróxido de urea.

- Equipo para anti-HBc por ELISA de Organon Teknika que contiene:

- 2 soportes de tiras, cada uno con 3 tiras Microelisa con 12 pocillos sensibilizados con AgHBc (producidos en bacterias mediante ingeniería genética), envasados en un sobre con una bolsita de gel de sílica como agente anti-humedad.
- 1 vial con 22 ml de conjugado. Anti-HBc humano marcado con HRP.
- 1 vial con solución de TMB (ml) Tetrametilbenzidina - disuelta en dimetil sulfoxido.
- 1 vial con tampón sustrato (10 ml).
- 1 tira sellada con una tableta de peróxido de urea.
- 1 vial de seguridad con control negativo (2 ml). Suero humano anti-HBc negativo, conservado con 7.5 g/l de glicina y 1 g/l de ácido sódico.
- 1 vial de seguridad con control positivo (2ml). Suero humano anti-HBc positivo, conservado con 7.5 g/l de glicina y 1 g/l de ácido sódico.

- Equipo para anti-HBs por ELISA de Organon Teknika que contiene:

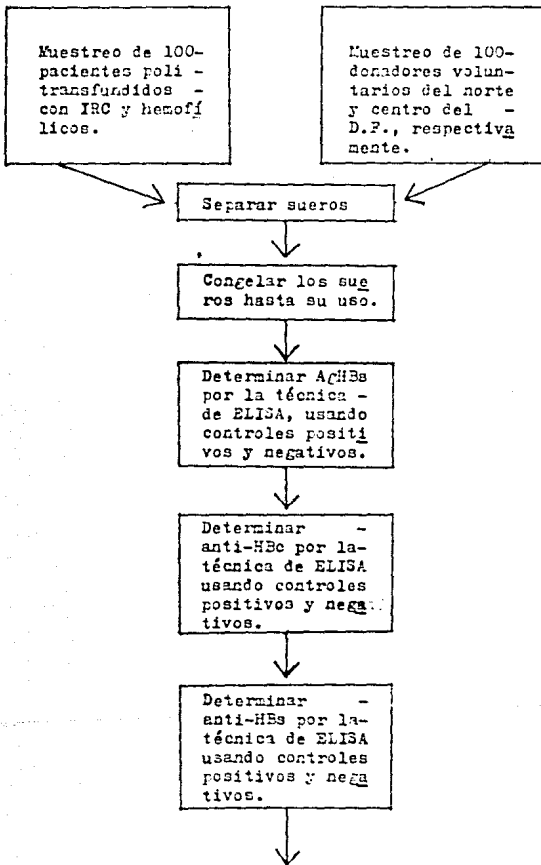
- 2 soportes, cada uno con 3 tiras Microelisa con 12 pocillos recubiertos con AgHBs subtipo ay y contenidos en una bolsa que lleva un sobre de gel de sílica como agente desecante.
- 1 soporte de bioseguridad lleno de algodón con 4 frascos conteniendo conjugado liofilizado (AgHBs subtipo ad marcado con HRP)
- 1 frasco con 25 ml de solvente para conjugado (suero humano diluido conservado con 0.1 g/l de mertiolato)

to.

- 1 frasquito de bioseguridad con 1.3 ml de control negativo (suero humano anti-HBs y AgHBs negativo, conservado con 0.1 g/l de sulfato de gentamicina y 0.2 ml/l de cinnaldehído).
- 1 frasquito de bioseguridad con 1.3 ml de control positivo bajo (suero humano con 10 UI/l de anti-HBs contra determinantes antigénicos generales de AgHBs, conservado con 0.1 g/l de sulfato de gentamicina y 0.2 ml/l de cinnaldehído).
- 1 frasquito de bioseguridad con 1.3 ml de control positivo alto (suero humano con 100 UI/l de anti-HBs contra determinantes anti-énicos generales de AgHBs conservado con 0.1 g/l de sulfato de gentamicina y 0.2 ml por litro de cinnaldehído).
- 1 botella con 100 ml de tampón fosfato concentrado, - que tiene que diluirse 25X antes del uso.
- 1 frasquito con 10 ml de tampón sustrato
- 1 tira sellada con 1 tableta de peróxido de urea.

- Agua bidestilada Electro pura
- Acido sulfúrico 1 N/l, solución para parar la reacción

6.5. DIAGRAMA DE FLUJO



Si existen sueros positivos a alguna de las pruebas realizar nuevamente la determinación a la semana y después a las dos semanas.

Analizar resultados.

Obtener conclusiones.

6.6 METODOS

6.6.1. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR AgHBs POR ELISA

Fundamento: La prueba es inmunoenzimática y se basa en el principio del sandwich.

anti-HBs-----AgHBs----- (anti-HBs)-HRP + sustrato

Anticuerpo en la fase sólida	Muestra positiva	Enzima-anticuerpo Conjugado
---------------------------------	---------------------	--------------------------------

Los pozos de la placa de poliestireno para microelisa -- han sido revestidos con anticuerpos monoclonales para AgHBs, lo cual constituye la fase sólida. Las muestras a probar son incubadas en cada pozo, si el AgHBs está presente en la muestra se unirá al anticuerpo de la fase sólida. Subsecuentemente un anti-HBs de carnero el cual ha sido marcado con la enzima HRP (peroxidasa de rábano picante) es adicionada. Con una reacción positiva este anticuerpo marcado llega a unirse a la fase sólida con el complejo anticuerpo-AgHBs previamente formado.

La incubación con la enzima-sustrato produce un color amarillo anaranjado en el pozo. Si la muestra no contiene AgHBs, el anticuerpo marcado no puede unirse específicamente y sólo un ligero color se desarrollará en el fondo del pozo.

Técnica:

- Tomar la placa de microelisa con el número de tiras requeridas.
- Pipetear 100 microlitros de cada muestra en los pocillos.
- Pipetear 100 microlitros de control negativo en dos po

zos.

- Pipetear 100 microbitros de control positivo en dos pozos.

- Cubrir la placa con una hoja adhesiva e incubar a 50°C por 30 minutos.

- Lavar cuatro veces con solución buffer de fosfatos.

- Pipetear 100 microlitros de conjugado en cada pozo con muestra o control.

- Cubrir la placa con una nueva hoja adhesiva e incubarla a 50°C por 30 minutos.

- Lavar cuatro veces con solución buffer de fosfatos.

- Preparar el sustrato como sigue:

Tabletas OPD (dihidrocloreuro de orto fenilendiamina) + Agua bidestilada + peróxido de urea

Una tableta es suficiente para una tira, cada tableta adicional es suficiente para dos tiras más, colocar las tabletas en un frasco limpio. Adicionar 2.5 ml de agua bidestilada por tableta. Preparar el sustrato por adición de 100 microlitros de peróxido de urea por cada 2.5 ml de solución de OPD. Nota: El sustrato es estable por aproximadamente 15 min., en la oscuridad para evitar su oxidación.

- Pipetear 100 microlitros de sustrato en cada pozo

- Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad por 30 minutos.

- Detener la reacción por adición de 100 microlitros de ácido sulfúrico 1 N

- Lectura en fotómetro: Leer un blanco sin placa, haciendo después la lectura a 492 nm.

Interpretación:

Un resultado negativo significa que la muestra probada -

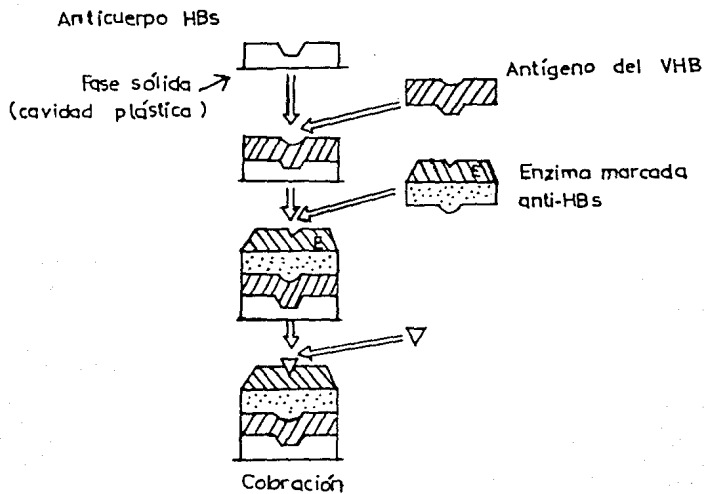
no contiene AgHBs o contiene AgHBs pero en un límite muy bajo no detectado por la técnica.

Un resultado positivo significa que la muestra probada contiene AgHBs o un factor reactivo no específico.

Dicha interpretación es dada por un valor de corte que se obtiene dividiendo entre dos la suma de los promedios de los controles positivos y negativos.

Una prueba positiva es considerada como tal si su absorbancia es mayor o igual que el valor de corte, en cambio una prueba negativa se considera si su absorbancia es menor que el valor de corte.

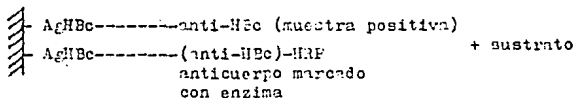
FIGURA No. 1



Prueba de ELISA para AgHBs de VHB

6.6.2. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ANTI-HBc POR ELISA

Fundamento: La prueba es un ensayo inmunoenzimático basado en el principio de inhibición.



Los pocillos de las tiras microelisa de poliestireno están sensibilizados con el antígeno core de la hepatitis B, lo que constituye el antígeno en fase sólida. La muestra se incubaba en el pocillo. En una muestra que sea anti-HBc positiva el AgHBc se bloqueará parcial o totalmente. A continuación se añade un segundo anti-HBc humano, el cual ha sido marcado con la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). Este anticuerpo marcado se ligará al antígeno en fase sólida que se halla libre. La incubación con el sustrato enzimático produce una coloración azul en el pocillo, la cual vira a color amarillo cuando se detiene la reacción con el ácido sulfúrico. Si la muestra contiene anti-HBc, sólo se desarrolla una leve coloración en comparación con los controles negativos.

Técnica:

- Abrir el sobre y sacar el soporte de tiras con el número deseado de tiras microelisa.
- Pipetear 100 microlitros de cada muestra en los pocillos.
- Pipetear 100 microlitros de control negativo en dos pocillos.

- Pipetear 100 microlitros de control positivo en dos po
zos.

- Sellar las tiras con una hoja adhesiva
- Incubar a 37°C durante 60 minutos
- Lavar cada pocillo cuatro veces con buffer de fosfatos
- Pipetear 100 microlitros de conjugado en cada pocillo
- Sellar las tiras con un nuevo adhesivo
- Incubar a 37°C durante 60 minutos
- Lavar cada pocillo cuatro veces con buffer de fosfatos
- Poner a temperatura ambiente el vial con solución de -
TMB a 20-25°C antes de usarlo. La solución de TMB (tetrame -
tilbencidina disuelta en dimetil sulfóxido) debe ser totalmen
te líquida. Para cada cuatro tiras se prepara 5.6 ml de solu
ción de sustrato del siguiente modo: añadir 0.5 ml de tampón-
peróxido-sustrato a 5 ml de agua bidestilada y mezclar. Aña
dir 100 microlitros de solución de TMB y mezclar. La solu -
ción de sustrato tiene que ser casi incolora cuando se emplee.
Nota: El sustrato es estable por aproximadamente 15 min., en
la oscuridad para evitar su oxidación.

- Pipetear 100 microlitros de solución de sustrato a ca
da pocillo.

- Incubar a temperatura ambiente en la oscuridad por 30
minutos.

- Parar la reacción añadiendo 100 microlitros de ácido -
sulfúrico 1N

- Lectura fotométrica: hacer el blanco del lector sin -
soportes ni tiras dentro y leer la absorbancia de la solución
de los pocillos a 450 nm.

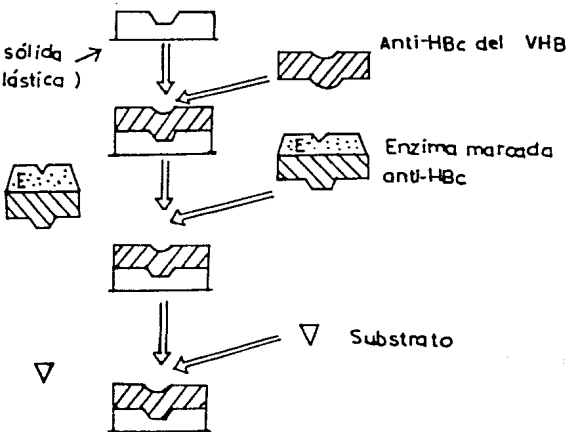
Interpretación:

Un resultado negativo significa que la muestra analizada o no contiene anti-HBc o contiene anti-HBc por debajo del límite de detección de la técnica. Este será el caso cuando no existe hepatitis por infección del virus B, durante el período de incubación o después de una completa recuperación de una infección remota con pérdida de anti-HBc detectable. Un resultado positivo significa que la muestra contiene anticuerpo por al AgHBc e indica que el paciente ha contraído la hepatitis B alguna vez, previamente.

FIGURA No 2

Antígeno HBc

Fase sólida
(cavidad plástica)

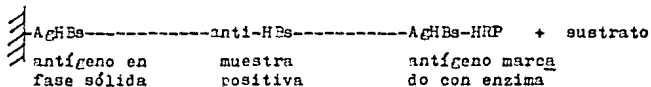


Ausencia de color

Prueba de ELISA para Anti-HBc de VHB

6.6.3. PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR ANTI-HBs POR ELISA

Fundamento: La prueba es un enzima-inmuno análisis basado en el principio del sandwich.



Los pocillos de las tiras de poliestireno microelisa se han recubierto con antígeno de superficie de la hepatitis B, que constituye el antígeno en fase sólida. La muestra se incubaba en uno de estos pocillos; anti-HBs, si está presente en la muestra se ligará al antígeno en fase sólida.

En continuación se añade AgHBs que se ha marcado con el enzima peroxidasa de rábano picante (HRP). En caso de una reacción positiva este antígeno marcado se liga al complejo de anti-HBs en fase sólida/antígeno que se haya formado anteriormente. La incubación con sustrato enzimático produce un color azul en el pocillo de prueba, que se vuelve amarillo cuando se para la reacción con ácido sulfúrico. Si la muestra no contiene anti-HBs, entonces el antígeno marcado no puede ligarse específicamente y sólo se desarrolla en último término una leve coloración.

Técnica:

- Abrir la bolsa y sacar el soporte con el número deseado de tira microelisa.
- Pipetear 100 microlitros de cada muestra de prueba en los pocillos.
- Pipetear 100 microlitros de control negativo en dos pocillos.

- Pipetear 100 microlitros de control positivo en dos pocillos.

- Cubrir las tiras con adhesivo.

- Incubar 60 minutos a 37°C

- Lavar cada pocillo 4 veces, esto con buffer de fosfatos

- Durante el proceso de lavado, para cada 4 tiras, abrir un frasquito que contiene conjugado liofilizado. Añadir 5.6 ml de solvente para conjugado a cada frasquito, dejar que se disuelvan por completo (unos tres minutos) y homogeneizar. Mezclar los contenidos en caso de utilizar más de un frasquito.

- Pipetear 100 microlitros de la solución de conjugado a cada pocillo.

- Cubrir las tiras con nuevo adhesivo.

- Incubar 60 minutos a 37°C

- Lavar cada pocillo 4 veces con solución buffer de fosfatos.

- Unos diez minutos antes del proceso de lavado, dejar que el frasquito que contiene la solución TMB alcance 20 a 25°C antes de emplearla. La solución TMB tiene que estar completamente líquida (punto de fusión 18°C). Para cada 4 tiras se preparan 5.6 ml de solución sustrato como sigue: añadir 0.5 ml de peróxido/tampón sustrato a 5 ml de agua destilada y mezclar. Añadir 100 microlitros de solución TMB y mezclar. La solución sustrato tiene que ser casi incolora cuando se emplee.

Para preparar el peróxido/tampón sustrato, disolver la tableta de peróxido de urea en 10 ml de agua destilada y mezclar de ésta solución se añade 1 ml al frasquito que contiene el tampón sustrato. Esta solución se denomina peróxido/tampón sustrato.

Nota: El sustrato es estable por aproximadamente 15 min. en la oscuridad para evitar su oxidación.

- Pipetear 100 microlitros de solución sustrato a cada pocillo.

- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

- Parar la reacción añadiendo 100 microlitros de ácido sulfúrico 1 N a cada pocillo.

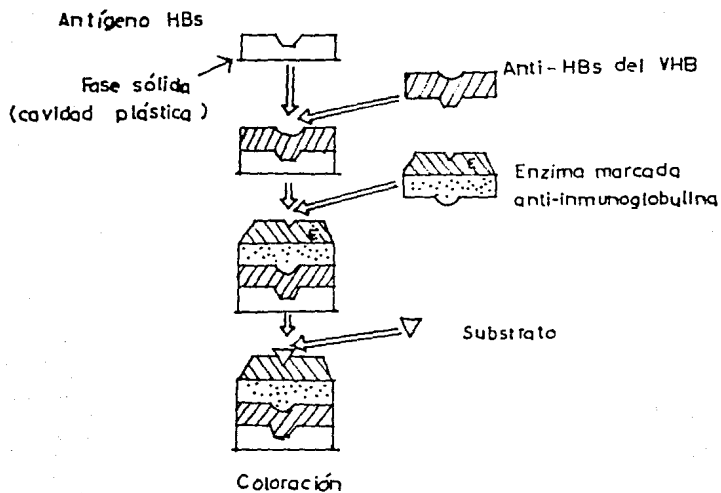
- Lectura fotométrica: hacer el blanco en el lector sin las tiras ni el soporte dentro y medir la absorbencia de la solución de los pocillos a 450 nm.

Interpretación:

Un resultado negativo significa que en la muestra no se han detectado anticuerpos anti-HBs. Es el caso de individuos no protegidos por inmunidad humoral frente al virus de la hepatitis B, o pacientes en fase de recuperación de una infección aguda por el virus de la hepatitis B.

Un resultado repetidamente positivo significa que la muestra contiene anticuerpos contra el AgHBs, indicando generalmente la presencia de una inmunidad humoral frente al virus de la hepatitis B.

FIGURA No. 3



Prueba de ELISA para Anti-HBs de VHB

6.7. METODOS ESTADISTICOS

6.7.1. VALIDEZ DE LAS DETERMINACIONES POR ELISA (23,24,25)

La comprobación de la validez en cada determinación por ELISA, se realizó de acuerdo al modelo matemático que la casa comercial indica para cada prueba.

6.7.2. ANALISIS DE FRECUENCIAS E HISTOGRAMAS PARA DETERMINAR LOS MARCADORES SEROLOGICOS DE HEPATITIS B MAS FRECUENTES EN POBLACION SAÑA (DONADORA) Y PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS. (26)

En este estudio se empleo el histograma para representar una distribución de frecuencias en donde las variables a considerar, en este caso las absorbancias obtenidas tanto para AgHBs, Anti-HBc y Anti-HBs, se disponen en el eje horizontal y las frecuencias con que ocurren los valores de la variable se representaron en el eje vertical.

6.7.3. REGRESION MULTIPLE (27)

La palabra regresión surgió en 1880 cuando el científico inglés Sir Francis Galton, dedicado a investigaciones genéticas, trató de establecer la relación entre las características de padre e hijo. Al comparar las alturas de padres con las de sus respectivos hijos, notó que cuando los padres eran altos, los hijos, en general, no alcanzaban sus alturas y cuando los padres eran bajos de estatura, los hijos tendían a ser más altos que sus padres, de lo cual concluyó que las características genéticas tendían a "regresar" a un valor medio de la población.

El análisis de regresión es útil para determinar la forma probable de la relación entre las variables (la ecuación que relaciona a ambas variables) cuando hay un fenómeno de causa y efecto; y su objetivo principal es el de predecir o estimar el valor de una variable (dependiente, Y) correspondiente al valor dado de la otra variable (independiente X).

El análisis de regresión puede ser lineal o no lineal (curvilíneo) y también lineal simple o lineal múltiple; el lineal simple se ocupa de dos variables y el múltiple de tres o más variables.

En el presente estudio se usó un modelo de regresión múltiple en donde la variable dependiente fue Anti-HBc y como variables independientes AgHBs y Anti-HBs. El objeto de este análisis es describir que porcentaje de relación existe entre AgHBs y Anti-HBs con respecto a Anti-HBc y conocer así si alguno de estos marcadores influye sobre Anti-HBc.

Para el estudio de regresión múltiple se usaron las absorbancias de cada muestra, esto claro está, tomando en cuenta el valor de corte para poder determinar en cada caso si se trataba de una prueba positiva o negativa.

6.7.4. ANALISIS DE VARIANZA (26, 27)

El análisis de varianza (ANAVEVA) se puede definir como una técnica mediante la cual la variación total presente en un conjunto de datos se divide en varias componentes, cada una de las cuales tiene asociada una fuente de variación específica, de manera que en el análisis es posible conocer la magnitud de las contribuciones de cada fuente de variación a la variación total.

El desarrollo del análisis de varianza se debe principalmente a los trabajos de Sir R.A. Fisher realizados entre 1912 y 1962.

Las suposiciones en el análisis de varianza son fundamentalmente: la normalidad de las distribuciones, igualdad de varianzas, muestreo aleatorio y datos de tipo cuantitativo. La suposición de igualdad de varianzas para los diferentes tratamientos debe satisfacerse aproximadamente, aunque la violación de esta suposición no es muy seria si los tamaños de muestra de los diferentes tratamientos son iguales.

De acuerdo al modelo puede decirse que la desviación de una observación con relación a la gran media (desviación total) se descompone en efecto de tratamiento (desviación entre tratamientos) o desviación de cada tratamiento con relación a la gran media y, error residual (desviación dentro de tratamientos) o desviación de cada observación con relación a su propio grupo.

El objeto de realizar ANAVEVA en el presente estudio es determinar si tiene significancia realizar Anti-HBc en comparación con las pruebas de AgHBs y Anti-HBs.

6.7.5. PRUEBA CHI-CUADRADA DE INDEPENDENCIA-TABLAS DE CONTINGENCIA. (27)

Uno de los usos de chi-cuadrada es la prueba de hipótesis de que dos criterios de clasificación, cuando son aplicados a las mismas unidades elementales, son independientes.

La clasificación en dos criterios de los mismos individuos se hace en las llamadas tablas de contingencia, en la cual las "f" filas representan los niveles de un criterio y las "c" columnas representan los niveles del otro criterio de clasificación.

Se trata de probar la hipótesis nula de que en la población los dos criterios de clasificación son independientes. Si se rechaza la hipótesis nula, concluimos que los dos criterios de clasificación no son independientes sino dependientes.

Un cuadro cualquiera de la tabla formado por la interacción de un nivel de uno de los criterios con un nivel del otro criterio se le llama celda.

Las tablas de contingencia en el presente estudio se realizaron con el fin de observar si hay independencia o no, en las diferentes variables usadas, tales como: AfHBs, Anti-HEC y Anti-HBs en donadores y pacientes.

7. RESULTADOS

7.1. COMPROBACION DE LA VALIDEZ EN LAS DETERMINACIONES DE - ELISA.

Tabla No. 1

Comprobación de la validez en la determinación de AgHBs

PRIMERA DETERMINACION			
Población	Valor de corte	$\bar{N} < 0.400$	$\bar{P} - \bar{N} \geq 0.100$
Norte	0.142	0.0895 < 0.400	0.105 > 0.100
Centro	0.235	0.1235 < 0.400	0.223 > 0.100
Pacientes	0.178	0.1080 < 0.400	0.140 > 0.100
SEGUNDA DETERMINACION			
Posibles Positivas	0.238	0.107 < 0.400	0.148 > 0.100
TERCERA DETERMINACION			
Confirmatoria	0.208	0.104 < 0.400	0.208 > 0.100

\bar{N} = absorbancia media de los controles negativos

\bar{P} = absorbancia media de los controles positivos

Tabla No. 2

Comprobación de la validez en la determinación de Anti-HBc

PRIMERA DETERMINACION			
Población	Valor de corte	$\bar{P} < 0.500$	$\bar{N} - \bar{P} \geq 0.250$
Norte	0.822	0.210 < 0.500	1.224 > 0.250
Centro	0.730	0.227 < 0.500	1.006 > 0.250
Pacientes	0.701	0.080 < 0.500	1.243 > 0.250
SEGUNDA DETERMINACION			
Posibles Positivas	0.606	0.216 < 0.500	0.900 > 0.250
TERCERA DETERMINACION			
Confirmatoria	0.737	0.145 < 0.500	1.185 > 0.250

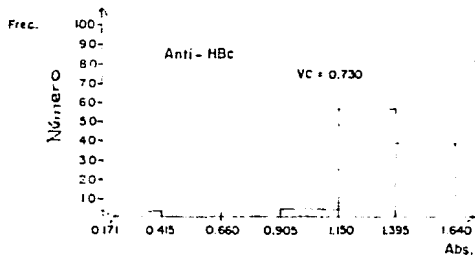
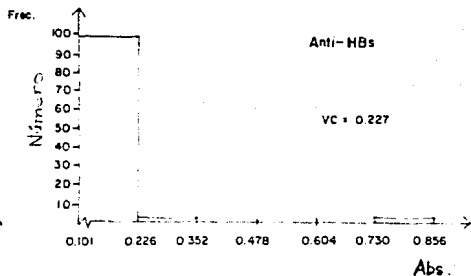
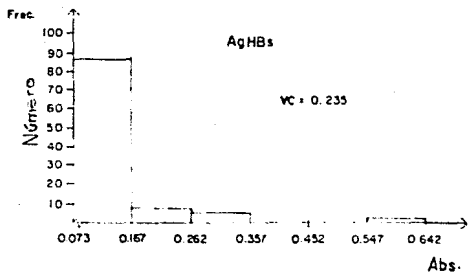
Tabla No. 3

Comprobación de la validez en la determinación de Anti-HBs

PRIMERA DETERMINACION			
Población	Valor de corte	$\bar{N} < 0.400$	$\bar{P} \geq 1.4\bar{N}$
Norte	0.410	0.263 < 0.400	0.557 > 0.368
Centro	0.327	0.134 < 0.400	0.322 > 0.188
Pacientes	0.389	0.221 < 0.400	0.557 > 0.309
SEGUNDA DETERMINACION			
Posibles Positivas	0.346	0.203 < 0.400	0.490 > 0.284
TERCERA DETERMINACION			
Confirmación	0.337	0.190 < 0.400	0.485 > 0.266

Las tablas 1, 2 y 3 muestran los valores de corte obtenidos por poblaciones, para las diferentes pruebas realizadas - AgHBs, Anti-HBc y Anti-HBs, así como la comprobación de la validez de dichas pruebas por el método de ELISA, de acuerdo al modelo matemático señalado por la casa comercial (Organon Teknika), esto, tomando en cuenta tanto promedio de controles positivos como negativos en cada determinación.

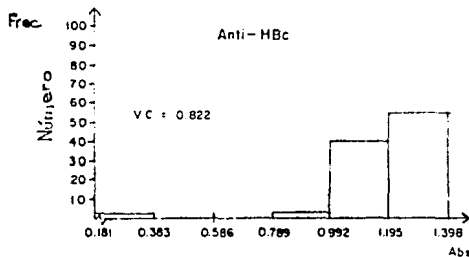
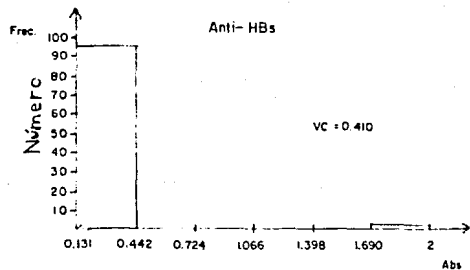
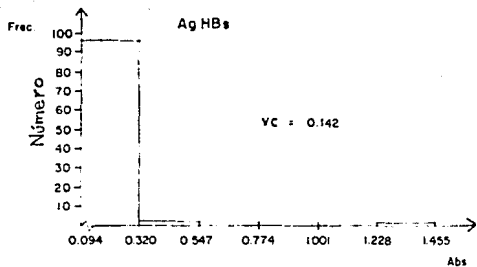
FIGURA No. 4



AL₃ = Atarbanca
Frec. = Frecuencia

Marcadores Serológicos de hepatitis B en 100 donadores de la zona centro del D.F.

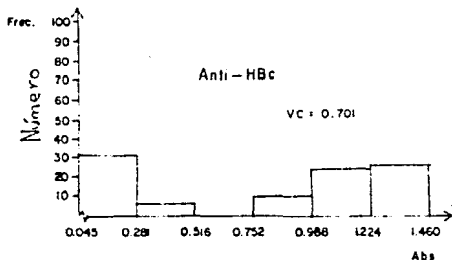
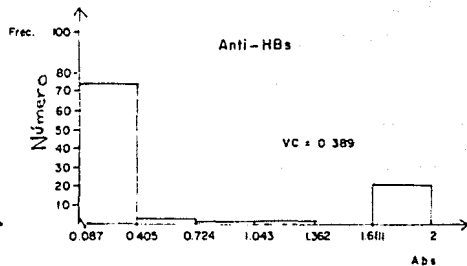
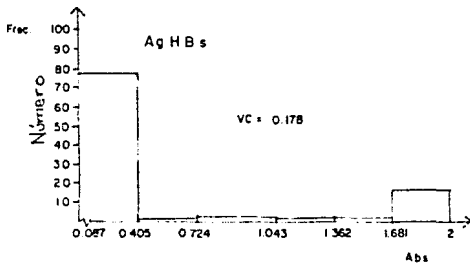
FIGURA No. 5



Ab_s = Absorbancia
 Frec = Frecuencia

Marcadores Serológicos de hepatitis B en 100 donadores de la zona norte del D. F.

FIGURA No. 6



Abs = Absorbancia
Frec = Frecuencia

Marcadores serológicos de hepatitis B en 100 pacientes politransfundidos

Tabla No. 4

Tabulación: V5 ZONA
por V6 ANTIGENO HBs

V6 → CONTEO		NEGATIVO	POSITIVO	Fila Total
		0	1	
V5				
CENTRO	1	95	1	100 33.3
NORTE	2	100		100 33.3
PACIENTES	3	78	22	100 33.3
Columna		277	23	300
Total		92.3	7.7	100.0

Chi-Cuadrada G.L. G.L. = Grados de libertad
43.60383 2

Chi-Cuadrada calculada mayor que Chi-Cuadrada de tablas se -
acepta Ho.

Ho. = Independencia

Ha. = No independencia

$X^2_{calc.} = 43.60383$

$X^2_{tab.} = 5.991$

$X^2_{calc.}$ mayor que $X^2_{tab.}$

Existe independencia entre Zona y AgHBs

En la tabla No. 4 puede observarse que el AgHBs tiene ma
yor positividad en pacientes que en la población donadora, -
aunque en la zona centro del D.F. hubo un caso positivo.

Tabla No. 5

Tabulación: V5 ZONA
por V7 ANTICUERPO HBe

V5	V7 →	CONTEO		Fila Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
		0	1	
CENTRO	1	98	2	100
				33.3
NORTE	2	97	3	100
				33.3
PACIENTES	3	62	38	100
				33.3
Columna		257	43	300
Total		69.7	14.3	100.0

Chi-Cuadrada G.L. G.L. = Grados de libertad
68.46440 2

$X^2_{calc.} = 68.46440$

$X^2_{tab.} = 5.991$

$X^2_{calc.}$ mayor que $X^2_{tab.}$

Existe independencia entre zona y Anti-HBe

En la tabla No. 5 se aprecia que el Anti-HBe presenta una mayor positividad en sueros de pacientes que de donadores.

Tabla No. 6

Tabulación: V5 ZONA
 por V8 ANTICUERPO HBs

V5	V8 → CONTEO	ZONA		Fila Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
		0	1	
CENTRO	1	98	2	100 33.3
NORTE	2	98	2	100 33.3
PACIENTES	3	76	24	100 33.3
	Columna Total	272 90.7	28 9.3	300 100.0

Chi-Cuadrada G.L. G.L. = Grados de libertad
 38.13025 2

χ^2 calc. = 38.13025

χ^2 tab. = 5.991

χ^2 calc. mayor que χ^2 tab.

Existe independencia entre Zona y Anti-HBs

En esta tabla se observan pacientes positivos a Anti-HBs y en mayor número que en la población donadora. No existe ninguna prevalencia en ambas zonas de donadores.

7.2. ANALISIS DE FRECUENCIAS E HISTOGRAMAS PARA DETERMINAR LOS MARCADORES SEROLOGICOS DE HEPATITIS B MAS FRECUENTES EN POBLACION DONADORA Y PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS.

En las figuras 4, 5 y 6 pueden observarse más muestras positivas a los marcadores serológicos de hepatitis B, en comparación con los de las tablas 4, 5 y 6. Esto es debido a que en los histogramas se representaron las frecuencias de las absorbancias obtenidas en la primer determinación para cada prueba.

En la prueba donde se observaron más muestras positivas, sospechando de resultados falsos positivos fué el caso del AgHBs, de aquí que las muestras sospechosas se realizaron una segunda vez resultando algunas negativas a AgHBs, no siendo necesario llevarlas hasta una tercera determinación para probar su negatividad. No así en el caso de muestras cuya positividad seguía persistiendo y en donde fué necesario realizarlas por triplicado. La misma metodología se siguió para Anti-HBc y Anti-HBs, observándose mucho menos casos de falsos positivos en comparación con AgHBs. Por lo anterior, la importancia de no dar un resultado positivo en la primer determinación.

Por tanto, las absorbancias obtenidas, de las muestras que se sospechaban positivas, en las determinaciones por duplicado o triplicado dieron la pauta para decidir si una muestra era positiva o negativa a determinado marcador de hepatitis B y fueron las que se usaron para la elaboración de las tablas 4, 5 y 6, así como de todos los demás métodos estadísticos. Las muestras que dieron resultados negativos desde la primer determinación, no fué necesario repetir las absorbancias obtenidas se usaron en la estadística empleada.

Tanto en los histogramas como en las tablas mencionadas se observó que la frecuencia de marcadores serológicos de hepatitis B en orden decreciente son Anti-HBc, Anti-HBs y AgHBs.

Los histogramas para AgHBs y Anti-HBs presentan cierta similitud en cuanto a su distribución ya que la positividad es directamente proporcional a la coloración. Mientras que los histogramas para Anti-HBc se observa otra distribución porque la positividad es inversamente proporcional a la coloración.

7.3. REGRESION MULTIPLE Y ANADEVA

ROTULO DE VARIABLES:

V1 DONADOR	V5 1 CENTRO 2 NORTE 3 FACIENTES
V2 AgHb	V6 0 NEGATIVO 1 POSITIVO
V3 ANTI-HBc	V7 0 NEGATIVO 1 POSITIVO
V4 ANTI-HBs	V8 0 NEGATIVO 1 POSITIVO
V5 ZONA	
V6 AgHb	
V7 ANTI-HBc	
V8 ANTI-HBs	

Tabla No. 7

REGRESION MULTIPLE

Variable Dependiente	V3	ANTI-HBc
Variable Independiente	V2	AgHb

Regresión Múltiple	0.43998
Cuadrado de la Regresión	0.19358
Ajuste del Cuadrado de la Regresión	0.19037
Error Estandar	0.36555

Análisis de Varianza

	GL	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados
Regresión	1	9.55362	9.55362
Residual	298	39.81975	0.13362

GL= Grados de libertad

F = 71.53407

La tabla No. 7 muestra el estudio de regresión múltiple que indica la existencia de una relación lineal ente AgHBs y - Anti-HBc que correspondería a sólo el 43.99%. Mientras la tabla de ANADEVA muestra que dicha relación no tiene significancia.

El modelo matemático que propone la regresión múltiple - es:

$$V3 = 1.20237 - 0.40221 \times V2$$

V2 AgHBs (lectura de absorbancia)

V3 ANTI-HBc (lectura de absorbancia)

Tabla No. 8

REGRESION MULTIPLE

Variable Dependiente	V3	ANTI-HBc
Variable Independiente	V4	ANTI-HBs
Regresión Múltiple	0.59368	
Cuadrado de la Regresión	0.35842	
Ajuste del Cuadrado de la Regresión	0.35626	
Error Estandard	0.32605	

Análisis de Varianza

	GL	Suma de Cuadrados	Promedio de Cuadrados
Regresión	1	17.69807	17.69807
Residual	298	31.08030	0.10631

GL = Grados de libertad

F = 166.47651

En la tabla No. 8 la regresión múltiple indica que existe una relación lineal entre Anti-HBs y Anti-HBc que correspondería a sólo el 59.868%, pero de acuerdo al análisis de varianza dicha relación no tiene significancia. La ecuación matemática para explicar dicha relación es:

$$V3 = 1.26338 - 0.49556 X V4$$

V3 ANTI-HBc (lectura de absorbancia)
V4 ANTI-HBs (lectura de absorbancia)

7.4. PRUEBA CHI-CUADRADA DE INDEPENDENCIA-TABLAS DE CONTIN
GENCIA PARA AgHbs, ANTI-HBc y ANTI-HBs EN DONADORES Y
PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS.

Tabla No. 9

Tabulación: V5 ZONA
por V6 ANTIGENO HBs
controlando para V7 ANTICUERPO HBc
= 0 NEGATIVO

		CONTEO		
V6 →		NEGATIVO	POSITIVO	Fila
		0	1	Total
V5				
CENTRO	1	97	1	98 38.1
NORTE	2	97		97 37.7
PACIENTES	3	55	7	62 24.1
	Columna	249	8	257
	Total	96.9	3.1	100.0

Chi-Cuadrada G.L. G.L. = Grados de libertad
18.28614 2

Chi-Cuadrada calculada mayor que Chi-Cuadrada de tablas
se acepta Ho.

Ho. = Independencia

Ha. = No independencia

$$X^2_{\text{calc.}} = 18.28614$$

$$X^2_{\text{tab.}} = 5.991$$

$X^2_{\text{calc.}}$ mayor que $X^2_{\text{tab.}}$

Existe independencia entre Zona y Anti-HBc cuando Anti-HBc se mantiene como constante negativa.

Tabla No. 10

Tabulación: V5 ZONA
 ppr V6 ANTIGENO HBs
controlando para V7 ANTICUERPO HBc = 1 POSITIVO

		CONTEO	NEGATIVO	POSITIVO	
V6 →			0	1	Fila Total
V5					
CENTRO	1		2		2 4.7
NORTE	2		3		3 7.0
PACIENTES	3		23	15	38 88.4
	Columna		28	15	43
	Total		65.1	34.9	100.0

Chi-Cuadrada

G.L.

G.L. = Grados de libertad

3.03102

2

Significancia

0.2197

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 3.03102$$

$$\chi^2_{\text{tab.}} = 5.991$$

Existe dependencia entre pacientes politransfundidos y AgHBs cuando Anti-HBc se mantiene como constante positiva.

Tabla No. 11

Tabulación: V5 ZONA
por V8 ANTICUERPO HBs
controlando para V7 ANTICUERPO HBc = POSITIVO

V5	V8 → CONTEO	ZONA		Fila Total
		NEGATIVO	POSITIVO	
CENTRO	1	1	1	2 4.7
NORTE	2	1	2	3 7.0
PACIENTES	3	19	19	38 88.4
	Columna Total	21 48.8	22 51.2	43 100.0

Chi-Cuadrada G.L. Significancia G.L. = Grados de libertad
0.31025 2 0.8563

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 0.31025$$

$$\chi^2_{\text{tab.}} = 5.991$$

Existe dependencia entre pacientes politransfundidos y Anti-HBs cuando Anti-HBc se mantiene como constante positiva.

En la tabla 11 puede observarse que las muestras que presentan Anti-HBc positivo sólo en un 50% aproximadamente presentan también Anti-HBs positivo.

Tabla No. 12

Tabulación: V5 ZONA
 por V8 ANTICUERPO HBs
 controlando para V7 ANTICUERPO HBc
 = NEGATIVO

		CUNTEO		Fila Total
V8 →		NEGATIVO	POSITIVO	
V5		0	1	
CENTRO	1	97	1	98 38.1
NORTE	2	97		97 37.7
PACIENTES	3	57	5	62 24.1
Columna		251	6	257
Total		97.7	2.3	100.0

Chi-Cuadrada G.L. G.L. = Grados de libertad
 11.98347 2

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 11.93847$$

$$\chi^2_{\text{tab.}} = 5.991$$

$\chi^2_{\text{calc.}}$ mayor que $\chi^2_{\text{tab.}}$.

Existe independencia entre Zona y Anti-HBs cuando Anti-HBs se mantiene como constante negativa.

Tabla No. 13

Tabulación: V6 ANTIGENO HBs
por V8 ANTICUERPO HBs

		CONTEO		
V8 →		NEGATIVO	POSITIVO	Fila
		0	1	Total
V6	NEGATIVO	0	0	0
	0	249	28	277 92.3
	POSITIVO	23		23 7.7
	1			
Columna		272	28	300
Total		90.7	9.3	100.0

Chi-Cuadrada

2.56424

G.L.

1

G.L. = Grados de libertad

$$\chi^2_{\text{calc.}} = 2.56424$$

$$\chi^2_{\text{tab.}} = 3.841$$

$\chi^2_{\text{calc.}}$ mayor que $\chi^2_{\text{tab.}}$

Existe dependencia entre AgHBs y Anti-HBs

La dependencia que se observa radica en que se presenta un solo marcador serológico en ausencia del otro, es decir, - sólo AgHBs o bien sólo Anti-HBs, cabe mencionar que esto se - observó en la población estudiada, aunque no se descarta la - posibilidad de que se presenten ambos marcadores.

7.5. RELACION DE MARCADORES SEROLOGICOS DE HEPATITIS B CON-
 IMPORTANCIA CLINICA, DETERMINANDO SI SE TRATA DE UNA -
 INFECCION AGUDA, ESTADO DE TRANSMISION O CONVALESCENCIA

Tabla No. 14

HEPATITIS TIPO B

RESULTADOS POSITIVOS PARA AgHBs, ANTI-HBc Y ANTI-HBs
 EN 100 DONADORES DE LA ZONA CENTRO DEL D.F.

MARCADORES CON IMPOR- TANCIA CLINICA	MUESTRAS POSITIVAS	PROBABLE ESTADO CLINICO
SOLO AgHBs	1	Infección aguda
SOLO ANTI-HBc	1	Infección aguda o infec- ción pasada reciente
SOLO ANTI-HBs	0	Convalecencia
AgHBs Y ANTI-HBc	0	
ANTI-HBc Y ANTI-HBs	1	Convalecencia temprana

En la tabla No. 14 podemos observar que en la zona cen-
 tro del D.F., sólo se encontró un donador con AgHBs positivo-
 lo que no es muy común, pero se puede decir que el donador se
 encuentra en la etapa aguda de la infección y que ésta sangre
 es potencialmente infecciosa. También se encontró un dona-
 dor con Anti-HBc positivo, o sea, en período de ventana, tam-
 bién potencialmente infeccioso, por último se aprecia un dona-
 dor en fase de recuperación temprana ya que presentó anticuer-
 pos tanto para Anti-HBc, como para Anti-HBs. Además de un-
 donador en estado de convalecencia por la presencia de -
 Anti-HBs.

Tabla No. 15

HEPATITIS TIPO B

RESULTADOS POSITIVOS PARA A_gHBs, ANTI-HBc Y ANTI-HBs
EN 100 DONADORES DE LA ZONA NORTE DEL D.F.

MARCADORES CON IMPOR TANCIA CLINICA	MUESTRAS POSITIVAS	PROBABLE ESTADO CLINICO
SOLO A _g HBs	0	
SOLO ANTI-HBc	1	Infección aguda o infec ción pasada reciente
SOLO ANTI-HBs	0	
A _g HBs Y ANTI-HBc	0	
ANTI-HBc Y ANTI-HBs	2	Convalecencia temprana

En la tabla No. 15 se observa un donador con Anti-HBc po
sitivo, en período de ventana y potencialmente infeccioso, ad
emás de dos donadores con positividad tanto para Anti-HBc co
mo para Anti-HBs, es decir en fase de recuperación temprana.

Tabla No. 16

HEPATITIS TIPO B

RESULTADOS POSITIVOS PARA A_gHBs, ANTI-HBc Y ANTI-HBs
EN 100 PACIENTES POLITRANSFUNDIDOS

MARCADORES CON IMPOR TANCIA CLINICA	MUESTRAS POSITIVAS	PROBABLE ESTADO CLINICO
SOLO A _g HBs	7	Infección aguda
SOLO ANTI-HBc	4	Infección aguda o infec ción pasada reciente
SOLO ANTI-HBs	5	Convalecencia
A _g HBs Y ANTI-HBc	15	Infección aguda o cróni ca
ANTI-HBc Y ANTI-HBs	19	Convalecencia temprana

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

En la tabla No. 16 se aprecian 7 pacientes con AgHBs positivo, sin poder determinar se están cursando por un período agudo o crónico de la infección por el virus de la hepatitis - B. Además se observan 4 pacientes con Anti-HBc positivo, en período de ventana y potencialmente infecciosos. También se encontraron 5 pacientes en período de recuperación con la sola presencia de Anti-HBs, así como 15 pacientes en fase aguda de la infección con positividad para los marcadores AgHBs y Anti-HBc, por último se encontraron 19 pacientes en recuperación temprana con la presencia tanto de Anti-HBc como de Anti-HBs.

8. ANALISIS DE RESULTADOS.

De acuerdo al modelo matemático que propone la casa comercial pudo demostrarse la validez en las determinaciones para AgHBs, Anti-HBc y Anti-HBs por la técnica de ELISA. Esto quiere decir que los controles positivos y negativos para cada prueba funcionan correctamente y que el valor de corte obtenido permite dar crédito a las determinaciones realizadas.

Se observó que el marcador serológico más frecuente de los tres usados es el Anti-HBc, seguido por Anti-HBs y por último AgHBs, prevaleciendo la positividad de éstos en la población de pacientes politransfundidos, sin encontrar ninguna diferencia importante en las dos poblaciones de donadores.

Por la experiencia en el presente trabajo, se observó que la técnica de AgHBs suele contaminarse muy fácilmente, lo que se aprecia al comparar los histogramas donde hay un mayor número de muestras positivas que en las tablas 4, 5 y 6 en donde el número de muestras positivas se reduce al realizarlas por duplicado o bien por triplicado, para corroborar las determinaciones. Por lo anterior el AgHBs hay que trabajarlo con sumo cuidado, evitando la contaminación por el manipuleo de las muestras, error en el volumen de suero tomado o contaminación con el medio ambiente. Evitando de esta manera falsos positivos. Este problema fué mínimo con las determinaciones para Anti-HBc y Anti-HBs, pero cabe mencionar que también hay que tener las mismas precauciones con dichas pruebas.

También se observó estadísticamente independencia entre población o zona y la presencia de los marcadores de hepatitis B estudiados. Es decir que no importa de que población sean las muestras para que un suero resulte positivo a determinado marcador.

Por medio de la regresión múltiple se obtuvieron ecuaciones que pretendían predecir la absorbancia de un marcador serológico de hepatitis B a partir de una absorbancia conocida de otro marcador, pero se observó que dichas ecuaciones no funcionaban en todos los casos.

Para demostrar lo anterior se escogieron algunos casos representativos tanto de donadores como de pacientes. Tal es el caso de la siguiente ecuación en donde se sustituyó la absorbancia de AgHBs obtenida en un suero de un donador de la zona centro del D.F. En dicha ecuación el marcador que se pretende predecir es Anti-HBc.

$$\text{Ecuación de regresión múltiple} \quad V3 = 1.20237 - 0.40221 \times V2$$

Donde:

$$\begin{aligned} V2 &= \text{AgHBs} & V3 &= \text{Anti-HBc} \\ V2 &= 0.107 & & \text{Absorbancia de un suero AgHBs negativo} \end{aligned}$$

De lo cual:

$$V3 = 1.159 \quad \text{Absorbancia esperada de Anti-HBc correspondiente a una muestra negativa}$$

Mientras que la absorbancia experimental fué 0.183, absorbancia correspondiente a un Anti-HBc positivo.

Lo mismo se observó en el caso de un donador de la zona norte del D.F., donde al sustituir el valor de absorbancia de Anti-HBc en la ecuación y pretender predecir el valor de AgHBs se observó lo siguiente:

$$V2 = \frac{1.20237 - V3}{0.40221}$$

$$V3 = 0.99 \quad \text{Absorbancia de un Anti-HBc positivo}$$

De lo cual:

$$V2 = 2.745 \quad \text{Absorbancia esperada de un AgHBs positivo}$$

Mientras que el valor experimental fué de 0.184 que co -

responde a una muestra negativa a AgHBs.

La segunda ecuación obtenida fué la siguiente:

$$\text{Ecuación de regresión múltiple} \quad V3 = 1.26338 - 0.49556 \times V4$$

Donde:

$$V3 = \text{Anti-HBc} \quad V4 = \text{Anti-HBs}$$

En esta ecuación el valor que se quiso predecir es Anti-HBc, sustituyendo el valor de absorbancia de Anti-HBs de un paciente multitransfundido.

$$V3 = 0.144 \quad \text{Absorbancia de un Anti-HBs positivo}$$

De lo cual:

$$V3 = 1.19201 \quad \text{Absorbancia esperada de una muestra negativa a Anti-HBc.}$$

Mientras que el valor obtenido experimentalmente fué 0.138 correspondiente a una muestra Anti-HBc positivo.

Por otro lado al tratar de predecir Anti-HBs a partir de Anti-HBc en el caso de un paciente multitransfundido se observó lo siguiente:

$$V4 = \frac{1.26338 - V3}{0.49556}$$

$$V3 = 0.105 \quad \text{Absorbancia de un Anti-HBc positivo}$$

De lo cual:

$$V4 = 2.3375 \quad \text{Absorbancia correspondiente a un suero Anti-HBs positivo.}$$

Mientras que el valor obtenido experimentalmente fué de 0.095 que corresponde a un suero Anti-HBs negativo.

La importancia que adquiere la determinación de Anti-HBc por representar una posible replicación viral, se demuestra en el análisis estadístico realizado en los cuadros de contingencia donde se observó que cuando Anti-HBc se mantiene como constante positiva, las variables tanto AgHBs como Anti-HBs resultan ser dependientes con respecto a la población de pa -

cientes, es decir que el número de casos de sueros positivos a Anti-HBc y AgHBs o bien Anti-HBc y Anti-HBs es mayor que cuando sólo se realizan AgHBs y Anti-HBs, manteniendo a Anti-HBc como constante negativa.

Puede corroborarse que no existe ninguna diferencia significativa en cuanto a la presencia de los marcadores serológicos de hepatitis B en las dos poblaciones de donadores estudiados del D.F., lo cual puede apreciarse en las tablas 14, 15 y 16.

La presencia del período de ventana pudo advertirse en las dos poblaciones de donadores, así como en la de pacientes pero en mayor número. De aquí la importancia de realizar Anti-HBc como una prueba más en la rutina de Banco de Sangre.

9. CONCLUSIONES

- 9.1. La comprobación de la validez en las determinaciones - realizadas por ELISA, permitió dar crédito a dichas - pruebas.
- 9.2. La frecuencia de marcadores serológicos de hepatitis B tanto en pacientes como en donadores, en orden decre - ciente es: Anti-HBc, Anti-HBs y AgHBs.
- 9.3. No hay ninguna frecuencia relevante en la presencia - de marcadores de hepatitis B en las dos poblaciones de donadores (centro y norte del D.F.)
- 9.4. No importa de cual de las tres poblaciones estudiadas - sean las muestras para que un suero resulte positivo a determinado marcador serológico de la hepatitis B.
- 9.5. Los modelos matemáticos obtenidos por medio de la regresión múltiple no funcionaron para predecir la absor**bc** bancia de un marcador serológico de hepatitis B a par**ti** r de una absorbancia conocida de otro marcador.
- 9.6. El Anti-HBc resultó ser una marca distintiva en un nú - mero elevado de pacientes politransfundidos que presen**t** taron simultáneamente, ya sea Anti-HBs o AgHBs.
- 9.7. Debido al elevado número de pacientes politransfundi - dos con marcadores serológicos de importancia clínica - para la hepatitis B positivos, el riesgo mayor de pre - sentar un estado infeccioso que en la población donado**r** ra.

9.8. El período de ventana existe en nuestra población donadora en un 1% de acuerdo al presente estudio y en un 4% en pacientes politransfundidos. Por tanto el riesgo de transmisión de hepatitis B por transfusión sanguínea o contacto sanguíneo con pacientes politransfundidos también existe.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Sepulveda B, et al., Monografía No. 3 del Instituto de -
Salubridad y Enfermedades Tropicales, Symposium sobre He-
patitis Infecciosa, México, D.F., 1963, p.p. 11-15
2. Ladd Daniel J., Métodos y diagnósticos del laboratorio -
clínico, Pruebas de Hepatitis, Capítulo 56, Ed. Interame-
ricana, México, 1978, p.o. 1077-1087
3. Toog-Sanford-Davidsohn, Diagnóstico y Tratamiento Clíni -
cos por el Laboratorio, Virus, rickettsias y clamidias, -
Salvat Editores, S.A., 8a. ed., Barcelona, 1988, p.p 1595
1596
4. Mollison, Transfusión de Sangre en Medicina Clínica, Ed.--
Reverté S.A., Barcelona, 1987, p.p.895-901
5. Burke A. Cunha, Guverich, Hepatitis Viral, Mundo Médico,-
Octubre 1983, p.p. 13-15
6. Rodés J., Bruguera M., Hepatología, Atlas práctico para e
el Médico General, Hepatitis aguda y crónica, Salvat Edi-
tores, S.A., 1a. Ed., Barcelona, 1983, p.p. 1-11
7. Hoofnagle et al, Symposium Type A and Type B Hepatitis, -
Laboratory Medicine, Vol 14 No. 11, November 1983, p.n. --
705-711
8. Jawetz et al., Microbiología Médica, Virus de la hepati -
tis, Ed. El Manual Moderno, Undécima ed., México D.F., -
1985, n.p. 428-434
9. Hoofnagle et al, Immunoglobulin M Antibody to Hepatitis B
Core Antigen in Patients with Chronic Type B Hepatitis, -
Gastroenterology, 1985, n.p. 252-257

10. Deinhardt, Medical Perspective, Predictive Value of Markers of Hepatitis Virus Infection, The Journal of Infectious Diseases, Vol. 141, No. 3, March 1980, p.n. 299 - 308
11. Vyas-Perkins, Non-B Post Transfusion Hepatitis Associated with Hepatitis B Core Antibodies in Donor Blood, - The New Eng J Med, Vol 306, No. 12, p.p. 749-750
12. Gitnick Gary M.D., Symposium Non-A, Non-B Hepatitis: Etiology and Clinical Course, Laboratory Medicine, Vol. 14 No. 11, November, 1983, p.p. 721-726
13. Lander, et al., Anticore Antibody Screening of Transfused Blood, Vox Sang. 34: 77-80 (1978).
14. Linares J., Inmunohematología y transfusión, Ed. cromotip C.A., Caracas, 1a. Edición, 1986, p.p. 331-382
15. Walsh et. al., Post Transfusion Hepatitis After Open-Heart Operations, JAMA, Jan 12, 1970, Vol. 211, No. 2 - p.p. 261-265
16. Cázares et al., Investigación del Antígeno de Superficie del Virus de la Hepatitis B, Revista Mexicana de Patología Clínica, México, Vol. 32, No. 2, Abril-Junio, 1985, - p.n. 71-73
17. Prince Alfred et al., Long Incubation Post-Transfusion -Hepatitis without Serological Evidence of Exposure to Hepatitis-B Virus, The Lancet, August 3, 1974, p.n. 241-246
18. Rosser et al, Fibrinogen Transmitted Hepatitis, JAMA, - Feb 7, Vol. 195, No. 6, 1966, p.p. 143-147
19. Ayala G. et al., Hepatitis viral B: exposición ocupacional en el personal de un hospital de tercer nivel, Rev. - Med. INSS (Mex), 1985; 23, p.n. 55-58

20. Anderson R.A., et al., Hepatitis B virus infection in the acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In: *Vyas, Viral Hepatitis and Liver Disease*. Orlando : Grune and Stratton, 1984: 339-343
21. Hyo-Suk Lee et al., Specificity of enzyme immunoassay for hepatitis B core antibody used in screening blood donors, *Transfusion*, Vol. 27, No. 1, 1987, p.p. 103-106
22. Herbert F, et al., Symposium Transfusion-Associated Hepatitis A Dilemma, *Laboratory Medicine*, Vol. 14, No. 11, - November, 1983 p.p. 717-720
23. Laboratorio Organon Teknika, Hapanostika AgHBs, Microelisa system, October 1986, p.p. 1-10
24. Laboratorio Organon Teknika, Hapanostika anti-HBc, Microelisa system, October 1986, p.p. 23-26
25. Laboratorio Organon Teknika, Hapanostika anti-HBs, Microelisa system, October 1986, p.p. 46-56
26. Martín del Campo, Texto básico para control estadístico de calidad, Celanese Mexicana, S.A., Ocotlán, Jalisco-México, 1974, p.p. 8, 163-172
27. Márquez de Cantú M. J., Probabilidad y estadística para Ciencias Químico Biológicas, 1a. Edición, UNAM, ENEP Zaragoza, México, D.F., 1988, p.p. 344-345, 361-366, 425-428