

N° 72
2 EJ



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**HEPATITIS "B"
(TRABAJO MONOGRAFICO DE
ACTUALIZACION)**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
HECTOR HERNANDEZ REYES



MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

	PAGINA
OBJETIVOS	1
INTRODUCCION	2
CAPITULO I (biología)	
.- Morfología	5
.- Clasificación	8
.- Variantes antigénicas (hepatitis B y D)	10
.- Ciclo reproductivo del virus de la hepatitis B	11
.- Regulación genética	14
CAPITULO II	
.- Patogénesis invitro	16
.- Hipótesis de la infección latente	19
.- Cuadro clínico de la hepatitis B	20
.- Diferencias entre la hepatitis B y A	23
.- Diferencias entre la hepatitis B y la no A, no B	30
.- Relación de la hepatitis B con la hepatitis delta	34
CAPITULO III (Técnicas de identificación)	
.- Introducción	37
.- Ouchterlony	38
.- Contra inmunoelectroforesis	40
.- Aglutinación en latex	42
.- Hemaglutinación reversa pasiva	44
.- Inhibición de la hemaglutinación	45
.- Fijación de complemento	46
.- Inmunofluorecencia directa é indirecta	48
.- Radio inmuno analisis	51
.- Técnica de hibridación de DNA	53

	PAGINA
.- Enzyme linked inmunoabsorbent assay	55
.- Método indirecto	
.- Método del sandwich	
.- Método competitivo	
.- Método de Anti- Ig M	
.- Prueba de confirmación por inhibición	

CAPITULO IV (Prevención)

.- Introducción	64
.- Inmunización activa	65
.- Vacuna recombinante "Gen Hevac B"	68

CAPITULO V

.- Introducción	72
.- Incidencia de cifras epidemiológicas en México durante los años 1989-1990.	74

CONCLUSION	85
------------	----

BIBLIOGRAFIA.	88
---------------	----

O B J E T I V O S

- .- Recopilar la información general y específica más reciente sobre el virus de hepatitis "B".
- .- Hacer una comparación sobre las distintas hepatitis virales tomando en cuenta sus agentes etiológicos, así como su patogenicidad en el hombre y - en modelos experimentales.
- .- Hacer una revisión sobre las técnicas de identificación comunes y más sofisticadas del virus de la hepatitis "B".
- .- Hacer una revisión sobre las medidas de prevención que en la actualidad se consideran las más adecuadas.
- .- Mostrar la incidencias de hepatitis B durante los años de 1989 - 1990 en la República Mexicana.

I N T R O D U C C I O N

Las hepatitis víricas son enfermedades comunes desde hace mucho tiempo, ya los textos clásicos griegos y romanos nos dan cuenta de epidemias de ictericia; como se sabe las ictericias son producidas generalmente por enfermedades del hígado ó hepatitis, y algunas de ellas son causadas por virus. La hepatitis es una de las pocas enfermedades graves del hombre cuya frecuencia parece estar aumentando como resultado de cambios en las condiciones - sociales y la carencia de una vacuna efectiva. (1,2) se trata, por tanto de un importante problema de salud pública, máxime si se tiene en cuenta que el virus de la hepatitis puede ser transmitido por cualquier medio.

Se sabe que cuando menos son dos los tipos de virus causantes - de las hepatitis virales; el descubrimiento del origen vírico - de tales afecciones data de principio de siglo, pero no fue sino en 1947 cuando se pudo distinguir entre hepatitis A y B .

La hepatitis A, también denominada infecciosa, es una enfermedad epidémica, se propaga bruscamente en poblaciones a partir de un foco inicial. La hepatitis B, denominada hepatitis sérica, no es epidémica, se transmite por el uso indebido de materiales contaminados con productos sanguíneos, se presenta de forma casi permanente en las poblaciones y la transmisión del virus se produce

mediante contacto íntimo entre las personas.

Actualmente, además de las enfermedades ocasionadas por estos - dos virus, se habla de otros tipos de hepatitis como la no A y no B, hepatitis C que probablemente sea causada por un virus to da v ia n o i d e n t i f i c a d o; (3,4).

En 1977 Mario Rizzeto (5) describe un nuevo tipo de hepatitis denominado delta, el virus de la hepatitis delta es un virus d e f e c t u o s o, ya que solo puede replicarse en presencia ó con la ayuda del virus de la hepatitis B, condición necesaria para que una vez establecida la hepatitis B, el virus de la hepatitis - delta puede manifestarse, por medio de una coinfección ó super infección. Otros virus que se han relacionado con el desarrollo de hepatitis virales son:

- .- Citomegalovirus
- .- Virus de herpes simple
- .- Varicela zoster
- .- Rubéola
- .- Coxackie
- .- Fiebre amarilla
- .- Otros agentes víricos aún no identificados.

La mayoría de los casos de hepatitis B se presenta en ciertas zonas endémicas como el Sureste Asiático, Pacífico Oeste, y Africa Subsahariana, la infección vírica es muy frecuente en estas poblaciones en las que el 80% de la gente ha entrado en co n t a c t o en un momento dado de su vida con el virus, las poblacio-

nes que menor contacto han tenido con el virus son: Europa Occidental y América del Norte. (6,7)

El resto del mundo: América del Sur, Europa del Este, Cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio, corresponde a regiones donde la frecuencia de la infección es moderada, estas variaciones de frecuencia en las zonas endémicas se debe esencialmente a las malas condiciones higiénicas y a una promiscuidad importante que favorece la propagación del virus de la hepatitis; cualesquiera que sea el mecanismo por medio del cual penetra al cuerpo humano, el virus está presente en la sangre, en la saliva y en las secreciones externas (heces, orina, sudor) por lo que todo contacto íntimo entre dos individuos, es fuente de contaminación (8,9). En los países occidentales, el problema de la hepatitis B se manifiesta de una forma distinta; la incidencia de la infección es baja y la enfermedad no es endémica.

En la hepatitis B, el grupo de más alto riesgo está constituido por personas en contacto directo con portadores crónicos, como aquellos que deben manipular sangre (personal médico), las que reciben determinados productos de sangre (receptores de transfusiones), personas que tienen múltiples compañeros sexuales, aquellas personas que a tienden heridas abiertas, personal de laboratorio.

La hepatitis delta depende de las zonas donde se presenta la hepatitis B, ya que se encuentra en las mismas zonas endémicas y las personas de más alto riesgo son: adictos a las drogas y homosexuales, los cuales se encargan de su propagación, fuera de estos grupos el virus de la hepatitis delta, se encuentra limitado para el resto de la población que no corre ningún riesgo de ser infectada (10).

CAPITULO I

MORFOLOGIA

El virus de la hepatitis B, algunas veces conocido también como partícula de Dane, posee una doble envoltura ó pared que envuelve a la cápside de simetría icosaédrica, en cuyo interior se encuentra el componente nuclear del virus que es una doble trenza de DNA y una DNA polimerasa (11, 12, 13).

La doble envoltura ó pared circundante de 7-8 nm de grosor, esta constituida por tres tipos de proteínas asociadas a una bicapa lipídica, cada una de ellas está codificada por regiones bien definidas del patrimonio genético, la proteína más abundante en la envoltura es la denominada proteína mayor, la que forma parte de la capa más externa; los otros dos tipos de proteína se encuentran en una cantidad menor formando la capa más interna de la envoltura; una se le llama proteína media y la otra se le conoce como proteína grande, la proteína media tiene una función importante ya que le permite al virus de la hepatitis B unirse a la albúmina sérica humana polimerizada, que le permite al virus transportarse al hígado en donde las células hepáticas portan un receptor para la albúmina.

La estructura molecular del antígeno de superficie llamada envoltura se le designa con las siglas HBs-Ag (Antígeno de superficie de hepatitis B), presenta hidratos de carbono, lípidos, - proteínas, la asociación de ellos y los residuos de hidratos de carbono forman la doble cobertura lipídica, glucolípidos, glucoproteínas; que se encuentran en la superficie del virus y en los capsómeros sintetizados en exceso los cuales presentan una forma

esférica ó de bastoncillos de 22 nm de diámetro, es estable en ester, a temperaturas de -20°C a 60°C durante 39 min. y a pH ácido.

La cápside que alberga el material genético, está constituida por un centro interno de 28 nm de diámetro y dos clases de -- proteínas denominadas antígenos de cápside HBc-Ag y HBe-Ag; la proteína C se encuentra dentro del núcleo de el virus, la proteína E está muy relacionada con la infección del virus y está formada en su totalidad por proteína soluble, mientras que la proteína C es insoluble, dentro de esta composición, también se han reconocido lipoproteínas y polipeptidos (14).

El genoma del virus de la hepatitis B presenta una originalidad, ya que el DNA del que está constituido, no tiene estructura en doble hélice, ya que solo un fragmento de su longitud -- total está compuesto por dos cadenas de DNA con un peso molecular de 1.6 millones de daltons.

El DNA dispuesto en círculo en el genoma, contiene al filamento largo ó L que comprende efectivamente 3200 nucleótidos y -- está prácticamente contenido en un círculo continuo con una -- única interrupción de posición fija (en relación con el orden de los nucleótidos encadenados) (15).

La otra cadena, denominada filamento S, es más corto, de hecho su longitud varía de una partícula vírica a otra de manera -- que el filamento L representa casi el 50% del genoma; el mantenimiento de la estructura circular está asegurada por el apareamiento de los filamentos, en uno de sus extremos a lo -- largo del segmento S de alrededor de 220 nucleótidos (fig 1.1) (16,17).

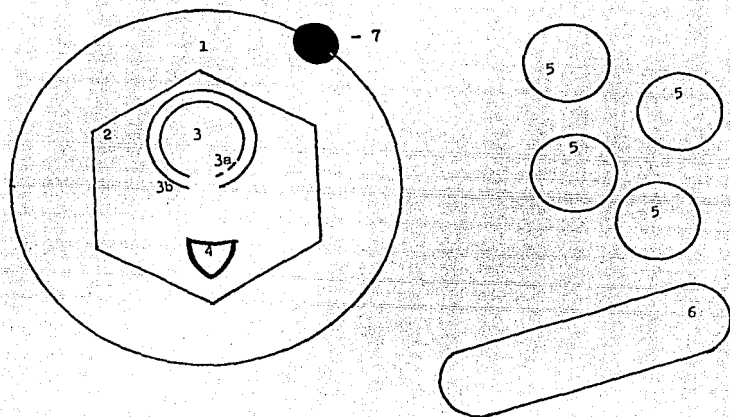


FIG 1.1

La hepatitis B se manifiesta por la presencia de diferentes partículas en la sangre del enfermo, la representación esquemática muestra: la envoltura externa (1) HBs-Ag, una cápside interna (2) antígenos de cápside HBc-Ag, HBe-Ag, el material genético - DNA (3) (3a. filamento "S" 3b. filamento "L") una DNA polimerasa (4), envolturas externas sintetizadas en exceso (5,6), y el receptor para la albúmina humana polimerizada (7) (18,19).

CLASIFICACION

En varias ocasiones se ha tratado de clasificar a los virus de diferentes maneras, pero en la mayoría de los casos el resultado de estas clasificaciones no ha sido bien aceptado; en realidad, el fracaso de muchos de los sistemas de clasificación propuestos se ha debido al escaso conocimiento de estos agentes infecciosos, tal es el caso del virus de la hepatitis B.

El acopio de nueva información sobre las propiedades de este virus, tanto biológica como físicas y químicas, hizo necesaria una clasificación más lógica que las intentadas con anterioridad, (dicha clasificación se basa en propiedades de su cuadro clínico) (20).

De acuerdo con el criterio del Comité Internacional de clasificación, los virus se agrupan por la similitud de sus características, sin tomar en consideración, la índole del huésped que infectan. Siguiendo este criterio, se dividen en dos grandes grupos los que tienen RNA y los que tienen DNA, por lo tanto el virus de la hepatitis B pertenece al segundo grupo ya que cuenta con un núcleo de DNA de doble cadena; el virus de la hepatitis es el prototipo de una familia de virus llamada hepadnavirus; en este grupo se han incluido a otros virus muy próximos al virus de la hepatitis B entre ellos esta el virus de la marmota (WHV), el virus de la ardilla terrera (GSHV), el virus del pato de Pekín (DHBV). Las partículas víricas de estos tres virus son muy parecidas al de la hepatitis B; ya que la partícula infecciosa contiene una DNA polimerasa y un genoma circular, hay grandes similitudes entre los antígenos de superficie

y de cápside, sus organizaciones genéticas son muy parecidas, todos estos virus tienen una propiedad en común y es la de poder inducir una infección crónica en sus huéspedes que conduce a un proceso carcinogénico ó cirrótico.

La clasificación de los virus hepática se debe principalmente a su organización genética (ya que comprende tres genes de función comparable), constitución química, la forma de la partícula completa, composición del ácido nucleico, tamaño y presencia de envoltura, simetría y número de cápsomeros (el número de cápsomeros aún no se ha determinado) (21,22).

El ciclo de replicación de los virus hepática es una imagen especular del ciclo de replicación de los retrovirus, todo ellos fue determinante para poder clasificar a estos virus en un grupo aparte.

**VARIANTES ANTIGENICAS
ENTRE EL VIRUS DE LA HEPATITIS B Y D**

Las determinantes específicas del subtipo del virus de la hepatitis B fueron descubiertas en 1970 por Lebouvier y posteriormente, Bancroft en 1975, las designo con las letras d, y, w, r y un determinante común denominado "a" que está presente en todos las variantes, de ahí que existan cuatro serotipos mayores del antígeno de superficie HBs-Ag, adr, ayr, adw, ayw; sin embargo también se han identificado subdeterminantes de "w" y "a" referidos como w-1, w-2, w-3, w-4, a1, a2, a3, (23,24).

Formando con ello el grupo de subdeterminantes antigénicas -- del antígeno de superficie de la hepatitis B; ayw1, ayw2, ayw3 ayw4, ayr, alyw, a2yw1, a2yw3, a2yw, adw2, adw1, adr, a2dw1, - a3dw (25).

El antígeno central designado con las siglas HBe-Ag y HBc-Ag conocido como cápside del virus de la hepatitis B, es común a todos los serotipos (26).

En el virus de la hepatitis delta, se han identificado dos -- proteínas una de 27 KD, y otra de 29 KD, estas dos proteínas forman parte de la composición de la proteína interna del virus de la hepatitis delta a lo que se le conoce también como antígeno delta (HDV-Ag), el cual es la única variante antigénica plenamente identificada y reportada hasta la fecha de -- realización de esta tesis (27).

CICLO REPRODUCTIVO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B

El mecanismo de replicación de los virus hepádnos, es la imagen especular del proceso normal de duplicación de los retrovirus, que pueden dividirse en tres fases superpuestas parcialmente:

- 1).- Adsorción
- 2).- Penetración
- 3).- Biosíntesis y Liberación

1). Adsorción

Para que se inicie una infección de hepatitis B, el virus debe establecer contacto con las células hepáticas y fijarse sobre ellas, esto ocurre cuando existe cierta afinidad entre la superficie celular hepática y la proteína media del virus de la hepatitis B; proteína que actúa como receptor para la albúmina sérica humana.

2). Penetración

Una vez que el virus de la hepatitis B ha establecido una interacción con la membrana hepática; la envoltura del virus B se comienza a "difundir" en la membrana plasmática del hepatocito, provocando con ello una fusión en el punto de contacto. Esta fusión tiene como resultado una alteración de la membrana plasmática de la célula hepática, provocando una invaginación, permitiendo que la nucleocápside sin envoltura pueda pasar directamente al citoplasma.

3). Biosíntesis

Una vez que el DNA vírico alcanza el núcleo, es copiado en un

gran número de moléculas de RNA gracias a la acción de una RNA polimerasa proporcionada por la célula huésped. La molécula de RNA resultante se denomina "pregenoma", la RNA polimerasa realiza también la síntesis del RNA mensajero de 2100 nucleótidos, y de este modo se sintetizan todas las proteínas víricas, las de la cápside se organizan cerca del pregenoma para rodearlo - de acuerdo con la DNA polimerasa vírica, el conjunto es trasladado al citoplasma de la célula hepática, (aunque hay razones para pensar que la encapsulación tiene lugar en el interior del núcleo y no en el citoplasma); el pregenoma es copiado entonces en una molécula de DNA merced a la DNA polimerasa, que a este nivel funciona por tanto como una retrotranscriptasa de retrovirus a medida que progresa la síntesis del filamento largo de DNA, el RNA va siendo destruido y la cápside queda finalmente empaquetada justo antes ó en el momento de su excreción por la célula hepática.

Este evento tiene por efecto la interrupción de la actividad - de la DNA polimerasa que había comenzado a recopiar el segundo filamento a partir del filamento de 3200 nucleótidos; esta es la razón por la que, el segundo filamento es más corto y de -- longitud variable, ya que ésta depende del lapso de tiempo que ha necesitado la DNA polimerasa para llevar acabo su trabajo - hasta la culminación del empaquetamiento.

Las proteínas sintetizadas y ensambladas en la cápside, migran hasta la membrana nuclear de la célula hepática, mediante un - proceso de gemación, las partículas víricas se rodean de una - envoltura formada por parte de citoplasma y membrana nuclear -

hepática, y se liberan al medio, en donde pueden eventualmente infectar una célula hepática vecina, con lo que se inicia un - nuevo ciclo (28,29).

REGULACION GENETICA

En el material genético del virus de la hepatitis B se han identificado por lo menos cuatro genes que han sido designados con las letras "S, X, C, P", que se traslapan notablemente unos -- con otros, la región P por encima de las otras tres (30).

El hecho de que los genes del virus de la hepatitis B se traslapen en lugar de estar dispuestos uno a continuación del otro tiene su razón de ser, es decir los mismos nucleótidos pueden -- intervenir de varias formas, en la codificación de la proteínas, según su posición relativa en el triplete, de manera que una mis ma cadena de DNA puede ser leída de varias maneras diferentes y conducir de este modo a la síntesis de varias proteínas distintas, de manera que se sintetizan mayor número de proteínas que en un genoma con un DNA contiguo; a esto se le conoce como prin cipio de economía ya que teniendo un genoma con un número reducido de nucleótidos, se puede tener síntesis de proteínas diver sas (31).

Se observó en 1979 que el gen S codifica para la proteína mayor del envoltorio del virus (antígeno de superficie HBs-Ag) está -- formado por 500 nucleótidos situados antes del gen S de manera que se puede pasar de la lectura de 500 nucleótidos a la región S, sin que fuera preciso cambiar el modo de agrupamiento de los nucleótidos; la región pre S interviene en la síntesis de dos tipos de proteínas de la envoltura, una se denomina proteína -- grande por que es de alto peso molecular, y está codificada por

la totalidad de las regiones pre S1, pre S2 y S.

La otra se denomina proteína media y su peso molecular es intermedio entre el de la proteína grande y el de la proteína mayor, está codificada por la región pre S2 asociada a la totalidad de la región S, esta proteína media tiene una función importante - permitiendo al virus de la hepatitis B penetrar en las células del hígado (32).

El gen C codificado para la proteína de la cápside portadora del antígeno HBc, HBe presenta secuencia de aminoácidos muy básicos de modo que una proteína de esta naturaleza debe de acoplarse - de forma muy estable con el ácido nucleico, lo cual resulta congruente con el hecho de que la proteína de la cápside envuelve íntimamente el genoma del virus de la hepatitis B, el gen C también se haya precedido por una región pre C de función aún desconocida.

El gen P codifica para una DNA polimerasa, enzima que permite - al virus B, la realización de nuevas copias de su material genético; la región P es muy larga, y cubre alrededor de las tres - cuartas partes del genoma, lo cual concuerda con el hecho de que la DNA polimerasa son moléculas complejas cuya secuencia de aminoácidos se parece a las secuencias de las enzimas denominadas retrotranscriptasa, de ahí su función muy próxima de retrotranscriptasa.

El gen X codifica para una proteína expresada en las células infectadas de algunos enfermos de hepatitis B, pero cuya función sigue siendo desconocida (33,34)

C A P I T U L O I I

PATOGENESIS IN VITRO

La patogénesis del virus de la hepatitis B es una infección cuyo mecanismo produce la lesión en la hepatitis, todavía no está bien determinado; esta falta de conocimiento se debe a la imposibilidad constante para cultivar el virus de la hepatitis B -- in vitro.

Los descubrimientos recientes de transmisión del virus a chimpancés en 1972 por Maynad y col., y en 1973 por Barker y Desmyter, y el progreso en la inmunología han facilitado una interpretación de los fenómenos que se producen en la hepatitis B, debido a la existencia de marcadores serológicos y antígenos virales, que proporcionan cuando menos una hipótesis sobre el mecanismo patógeno del virus B (35,36).

Los únicos huéspedes naturales del virus B son : el hombre y tal vez algunos primates como chimpancés, mono gibón, mono lanoso ó crespos, los cuales son altamente susceptibles a una infección experimental con virus B (37,38), con cada uno de los cuatro -- subtipos mayores del antígeno de superficie del virus B; estos estudios in vitro pusieron de manifiesto el mecanismo de la -- "infección latente", por medio del cual el virus de la hepatitis B ocasiona la infección al huésped (39,40), la manifestación -- clínica de la infección es una resultante de la interacción clásica entre los mecanismos de defensa del huésped y el invasor, de manera que la respuesta inmune del huésped dicta el curso y la severidad de la infección; el desarrollo de la respuesta inmune responde de acuerdo al daño llevado a cabo en la infección

de las células hepáticas del huésped ya que en ellas se ha podido comprobar la capacidad que tienen para poder expresar antígenos virales en la superficie celular, esto hizo creer que el componente celular (antígenos virales expresados en la superficie) eran los responsables de la respuesta inmune más importante, ya que la respuesta inmunológica es compleja y modulada por los componentes humorales y celulares del huésped (41,42).

Estos resultados demostraron que el virus B no es citopático - ya que se replica en el interior del hepatocito sin ocasionar daño alguno; la lesión del hepatocito tiene relación con los - linfocitos "T" (respuesta celular) que se han previamente sensibilizado frente al virus B, destruyen a los hepatocitos que contienen antígeno de superficie HBs-Ag y tras su lisis, el virus B es liberado y su eliminación de la circulación se realiza por medio de los anticuerpos correspondientes.

Cuando este sistema funciona, trae como consecuencia la cura - total, mientras que una respuesta deficiente en la inmunidad - permite la penetración del virus en células contiguas, ocasionando la cronicidad de la enfermedad, la ausencia de la respuesta inmune celular determina el estado del portador crónico, la formación del complejo antígeno-anticuerpo (HBs-Ag +Anti-HBs), en la fase inicial de la hepatitis y su depósito en otros órganos son responsables de la aparición de artritis glomerulonefritis y periartrosis (43,44).

Los resultados obtenidos en las etapas de la enfermedad, indi-

can que la lesión inicial es en el hepatocito, el cual se hincha con tendencia a la degradación vacuolar, hay degeneración y necrosis celular de intensidad y extensión variable, con ruptura - de las laminillas hepáticas, hay infiltración en los lobulillos y espacios porta, algunos hepatocitos se aprecian colapsados con escaso citoplasma; esta degeneración depende, probablemente de - la pérdida de agua intracelular a consecuencia de una alteración en la membrana celular (45,46).

Otros hepatocitos sufren el proceso inverso, de modo que adquie- ren un tamaño superior al normal; esta lesión recibe el nombre - de degeneración hidrópica y su progresión determina la lisis de la célula hepática, tanto en los espacios porta como en los sinu- soides; la presencia brusca de necrosis de los hepatocitos alte- ra las láminas hepáticas conduciendo al desarreglo del patrón lo- bulillar, esta lesión puede progresar favorablemente ó ser causa de muerte, de manera que el virus B compromete directamente al - hepatocito, mientras que la agresión es ocasionada por el meca- nismo autoinmune (47).

HIPOTESIS DE LA INFECCION LATENTE

Es la hipótesis que más se estudia en la actualidad ya que es la más atractiva para explicar la patogénesis de la hepatitis B postula que el virus B, no produce infección citolítica directa si no que, se introduce al hepatocito conservando la célula - su integridad funcional, después de un estado de latencia variable (período de incubación), se produce una respuesta inmunológica del huésped contra antígenos en la superficie de - la célula hepática; ya que una porción del DNA viral se integra dentro del genoma de la célula hepática, al replicarse, el DNA viral dirige la formación de antígenos estructurales virales, que son expresados en la superficie celular, que pueden ser partes del virus ó nuevos antígenos elaborados bajo la dirección del material genético viral (48, 49, 50).

CUADRO CLINICO DE LA HEPATITIS "B"

El cuadro clínico es muy variado y depende de las distintas etapas de patogénesis provocada por el virus B; en esta afección existe un mayor ataque al estado general de la persona que -- presenta exantemas cutáneos, artralgias, vasculitis, y otras manifestaciones que pueden estar en relación con la presencia de complejos inmunes.

La hepatitis B presenta un periodo de incubación de 50 a 150 días con un promedio de 70 días, generalmente sigue un curso típico y benigno, presentando una fase prodrómica de duración variable que se caracteriza por fatiga y anorexia, aumento in sidioso y duradero de las transaminasas en suero; en la fase preictérica hay fiebre, nunca mayor de 39°C, anorexia, náuseas, diarreas, calosfríos, cefalea, manifestaciones de tipo cata-- rral agudo, molestias abdominales y gastrointestinales; con sensación de pesadez en el área hepática.

El hígado se encuentra aumentando de volumen y se palpa abajo del borde costal en dimensiones variables; puede presentarse estreñimiento y vómito, durante esta fase que dura de 21 a 81 días con un promedio de cinco días, se observa falta de pig-- mento en heces ó acolia (51).

La fase icterica, se presenta en forma variable y en general, afecta desde un principio a las conjuntivas; en la mayoría de

los casos, tres a cinco días después, la ictericia es notoria - en la piel y la mucosa; al parecer la ictericia y la fiebre desaparece, así como otros signos y síntomas (52).

La fase icterica alcanza su máximo entre el día 10, presentando fiebre ligera que desaparece; el hígado está crecido y ligeramente doloroso, el vaso se palpa en algunos pacientes, la acolia es intensa y las evacuaciones pueden ser aún hipocólicas.

A partir de este momento, la ictericia comienza a desaparecer y 2 a 4 semanas después, toda la sintomatología ha desaparecido, - en ocasiones la etapa icterica es de más corta duración y puede incluso desaparecer a los 3 a 5 días de iniciada la fase icterica.

La fase posictérica con duración de 4 a 8 semanas, se caracteriza por la normalización de la sintomatología mencionada anteriormente; el paciente muestra apetito pero puede tener fácilmente signos de fatiga, malestar difuso, alteraciones gastrointestinales y el hígado aún puede ser palpado y ligeramente doloroso - (53).

El 10% de estos enfermos quedan con hepatitis crónica, la que sigue un curso prolongado que puede extenderse a 6 meses ó más.

La hepatitis fulminante tiene un curso progresivo, rápido y fatal en el enfermo, éste continua sintiéndose mal, pueden presen

tarse manifestaciones digestivas ó respiratorias, fiebre, anorexia, náuseas ó ictericia, con evolución al coma hepático, la hepatomegalia y la esplenomegalia no tienen tendencia a mejorar, en menos de tres meses se presenta la encefalopatía hepática que se divide en 3 etapas: en la etapa inicial hay alteraciones sutiles de la mente y personalidad que pueden manifestarse como variaciones del humor, irritabilidad, olvidos y confusión cuando el paciente evoluciona hacia la segunda etapa, éste se hace letárgico se observa lentitud mental, delirio, incoherencias la mayor parte del tiempo, así como somnolencia (54,55).

En la tercera etapa, el paciente puede presentar convulsiones, - hay ausencia total de respuestas, incluso ha estímulos, hay aumento de concentración de amonio en la sangre arterial, disminución del tamaño del hígado, más del 90% de los pacientes que presentan este tipo de evolución, fallecen dentro de la primera semana de iniciado el cuadro de coma hepático (56).

DIFERENCIAS ENTRE HEPATITIS "B" Y HEPATITIS "A"

Para poder diferenciar entre los dos tipos de hepatitis tenemos que basarnos en algunos aspectos como son: el período de incubación, en la hepatitis "A" es de 15 a 40 días (2 a 8 semanas con una media de 30 días), mientras que el de la hepatitis "B" es de 50 a 150 (8 a 26 semanas con una media de 90 días), es generalmente transmitida por vía parenteral ó por vía oral al igual que la hepatitis "A", si el período de incubación es largo, es seguro que la infección es de tipo "B", en el caso de la hepatitis "A", el ataque tiende a ser repentino, agudo, con fiebre alta, en contraste, en la hepatitis "B", tiende a ser incidioso, con fiebre leve y aparece un cuadro prodrómico con urticaria y prurito (57).

Los síntomas de fiebre, dolor de cabeza, malestar, fatiga, anorexia, náuseas, vómito, y diarrea ocurren en los dos tipos de hepatitis.

La comparación de otros caracteres que aparecen en el cuadro (2-2, 2-3, 2-4), han revelado que la hepatitis "A", es más frecuente en otoño e invierno afectando ha niños y adultos, jóvenes con un índice de mortalidad de aproximadamente de 2 por -- 1000 casos, mientras que en la hepatitis "B" no presenta variación estacional, puede afectar a cualquier grupo de edad, llegando a alcanzar un índice de mortalidad del 1% del total de casos (58).

Entre las pruebas para diferenciar entre hepatitis A y B se encuentra la determinación de ambas transaminasas séricas - (la glutámico-piruvica y la glutámico-oxaloacética), turbidez del timol, determinación de inmunoglobulinas, especialmente IgM, y la detección de antígenos virales.

El virus de la hepatitis A es un virus que tiene RNA de 27 nm de diámetro de simetría icosaédrica, es resistente al calor (60), éter, ácidos y sensible a la ebullición y a los rayos ultravioleta, se halla presente en las heces del enfermo desde unos días antes de la aparición de los síntomas, - 7-11 días después aparecen en el suero anticuerpos clase -- IgM (anti-HA), el título aumenta en el período de convalecencia y persiste por 6 meses; posteriormente se desarrollan anticuerpos de clase IgG, confiere inmunidad permanente frente a una exposición posterior a éste virus.

El virus de la hepatitis B es un virus de forma icosaédrica de 43 nm de diámetro, el core ó centro contiene en su interior DNA, de doble cadena (bicatenario) y una DNA polimerasa, la capa externa es de naturaleza lipoproteica; las diferencias esenciales entre los virus de la hepatitis A y B se han resumido en las tablas (2-2, 2-3, 2-4) (59).

**CUADRO 2-2 DIFERENCIAS PRINCIPALES ENTRE LAS
HEPATITIS "A" "Y" "B"**

Característica	Hepatitis A	HEPATITIS B
Acido nucleico	RNA de una sola cadena	DNA de doble cadena de peso molecular - de 1.6 millones de daltons.
Díámetro del Virión	27 nm	43 nm
Simetría	Icosaedrica	Icosaedrica
Transmisión 1 ^a	Fecal-bucal y -parenteral por secreciones nasofaríngeas, materias fecales en agua, animales y fomites.	Parenteral bucal y contacto directo.
Otras rutas	Por contacto directo	Transplacentaria heces, saliva.
Poder antigénico	No hay inmunidad cruzada con HBV	No hay inmunidad cruzada con hepatitis A
Período de incubación	de 15 a 30 días (corto)	de 50 a 150 días (largo)
Tipo de inicio	Agudo con aumento brusco de las transaminasas sérica y disminución brusca a los 19 días.	Insidioso, aumento duradero de las transaminasas sérica.
Síntomas que preseden a los ictericia	Fiebre, malestar anorexia, náuseas diarrea, problemas abdominales.	Fiebre, malestar náuseas, diarrea molestias abdominales.

**CUADRO 2-2 DIFERENCIAS PRINCIPALES ENTRE LAS
HEPATITIS "A" Y "B"**

Característica	Hepatitis A	Hepatitis B
Duración de la Fase preictérica	De 2 a 21 días	De 21 a 81 días
Fase ictérica	Brusca, con fiebre alta, e ictérica.	Insidiosa, con fiebre ligera e ictérica.
Pródromos	No hay artritis exantemática e ictérica.	Si puede haber artritis, exantemática e ictérica.
Incidencia estacional	Otoño-Invierno	Todo el año.
Grupo de edad afectados	Niños, jóvenes adultos.	Todas las edades.
Huésped sensible	Hombre, Chimpancés, tifi, marmosetas y otros monos.	Hombre, Chimpancés, mono gibón, mono Rhesus etc.
Cuadro clínico	Benigno	Puede ser grave.
Complicaciones	Rara vez	+ 10% de los casos
Mortalidad	Baja 0.1% de los casos	Elevados 0.5-1% de los casos
Marcadores séricos	Anti-HAV	HBs-Ag, anti-HBs HBe-Ag, anti-Hbe HBc-Ag, anti-Hbc
Antígeno "S" en sangre	No suele haber	Presenta durante el periodo de incubación y en la fase aguda; persiste en portadores sanos.

CUADRO 2-3 DIFERENCIAS PRINCIPALES ENTRE LAS
HEPATITIS "A" Y "B"

Característica	Hepatitis A	Hepatitis B
Virus en heces	Durante el período de incubación y en la fase aguda.	Según la puerta de entrada del virus puede encontrarse.
Virus en el contenido deodenal	3 días antes - del comienzo y en la fase aguda.	Durante el período de incubación y fase aguda.
Virus en sangre	3 días anteriores a la fase de incubación y fase aguda.	Durante el período de incubación y fase aguda.
Duración del estado de portador:	Común	0.2-0.3% de los casos.
en sangre	Hasta 8 meses (un adulto).	De 5 años a varios años (un adulto).
en heces	Hasta 16 meses (niño)	No se ha demostrado.
Valor profiláctico de la gamma-globulina	Bueno	Exitoso cuando se administra después de la transfusión.
Hepatitis activa crónica	Rara	Más común, 10% de los casos.
Otros nombres que recibe	Hepatitis Infecciosa, hepatitis epidémica	Hepatitis serica, por suero homólogo, posttransfusional.

**CUADRO 2-3 DIFERENCIAS PRINCIPALES ENTRE LAS
HEPATITIS "A" Y "B"**

Característica	Hepatitis A	Hepatitis B
Nivel de IgM y turbides de timol	Aumento con ictericia ó sin ella.	Normales en caso anictéricos, en casos ictericos aumentan.
Prueba diagnóstica	Biopsias de hígado, y cifras de transaminasas.	Cifras de transaminasas, biopsias de hígado.
SGOT ó SGPT	Pasajera de la 3 a semana.	Más prolongadamente de 1 a 8 meses.
Densidad en CsCl	1.32-1.34	2.24
Resistencia térmica: a 4'c 60 min.	Estable varias semanas y meses.	Estable
a 20'c 60 min.	Estable varios años.	Estable varios años.
a 50'c 60 min.	Estable	Estable
a 100'c 5 min.	Inactivo	No se sabe
a 56' c 30 min.	Sobrevive	Sobrevive
a 60' c 30 min.	No sobrevive	Sobrevive
a 60' c 10 min.	No sobrevive	Sobrevive
de-20' c a 10'c un año 1/2	Sobrevive	Sobrevive
de-20' c a 10'c cuatro años 1/2	No sobrevive	Sobrevive
Irradiación con rayos ultravioleta	Esta inactivo	No se sabe
Tricresol al 0.2%	No sobrevive	Sobrevive

**CUADRO 2-4 DIFERENCIAS PRINCIPALES ENTRE LAS
HEPATITIS "A" Y "B"**

Característica	Hepatitis A	Hepatitis B
Fenol-éter partes igual al 0.5%	Lo inactiva	Lo inactiva
Eter al 10% 24 hrs a 4'c.	Sobrevie	Lo inactiva
Triple extracción con éter del suero	Lo inactiva	No lo inactiva
Mostaza nitrogenada (500 mg. por litro)	Lo inactiva	Lo inactiva
Mostaza sulfatada (0.005 M)	Lo inactiva	Lo inactiva
Beta-propiolactona (4g por litro)	Lo inactiva	Lo inactiva

Fuente: (57,58,59).

DIFERENCIA DE LA HEPATITIS B Y LA HEPATITIS NOA-NOB

La observación de numerosos casos de hepatitis vírica en la que no se han identificado, desde el punto de vista serológico, los marcadores del virus A ó B, indica que estos casos no están relacionados ni con la hepatitis A ni con la hepatitis B.

En estos casos ha sido clasificados como hepatitis no A no B y pueden representar a una sola clase de hepatitis ó bien a diversas formas, los conocimientos limitados sobre la epidemiología de hepatitis no A- no B no han permitido identificar a él ó los agentes casuales de esta infección, aunque tampoco hay pruebas definitivas de que la hepatitis no A - no B sea causada por un solo agente infeccioso (60), los datos reunidos señalan firmemente una etiología viral en la que se ha observado que la hepatitis no A - no B inciden -- preferentemente en sujetos transfundidos, presentándose también como casos esporádicos; su período de incubación se encuentra al parecer, entre los de la hepatitis A y hepatitis B (alrededor de 49-91 días variando entre 2 semanas y 6 meses), el cuadro clínico es muy variado pero al igual en el caso de la hepatitis B, la hepatitis no A - no B al gunos enfermos pueden tener poca sintomatología, otros pueden presentar anorexia, náuseas, vómito, cansancio e ictericia, la enfermedad se presenta en algunos casos en ambos sexos y más frecuentemente en niños y jóvenes.

Los estudios han proporcionado pruebas convincentes de que la hepatitis no A - no B, es causada por un agente transmi

sible (Alter y col. 1978 y tabor 1978) (61).

Después de la inoculación en chimpancés con suero de enfermos con hepatitis no A - no B dio a conocer por pruebas bioquímicas e histológicas que las alteraciones anatómicas y patológicas de la hepatitis no A - no B son idénticas en los cambios morfológicos de degeneración, necrosis celular y extensión de la lesión en el hígado, que se presentan en los diferentes tipos de hepatitis existentes ("A", "B", "D", etc), de acuerdo - con esto, el mecanismo a través del cual lesiona las células hepáticas, es por medio de la infección latente, aunque no se ha logrado obtener suficiente información al respecto, es la hipótesis más acertada y que explica mejor el fenómeno observado (62).

Los estudios con microscopio electrónico en chimpancés, han demostrado partículas de apariencia viral tanto en el citoplasma, como en el núcleo de los hepatocitos y en el citoplasma de las células Kupffer de 23 a 30 nm. de diámetro, durante el cuadro de hepatitis no A - no B agudo de corta incubación en chimpancés, se han descrito cambios citoplasmáticos en el día 7-13, -seguidos de cambios nucleares a la semana después, por lo que se ha sugerido que probablemente sea solo un tipo de hepatitis no A - no B y que las diferencias en periodos de incubación (corta incubación 1-2 semanas; larga incubación 7-13 semanas) representan diferentes dosis infectantes, pero todavía no contamos con la confirmación y reproducibilidad de estos hallazgos, así que las características clínicas epidemiológicas e inmunológicas de la hepatitis no A - no B, se resumen - en el cuadro (2-5) (63).

**CUADRO 2-5 DIFERENCIAS INMUNOLOGICAS Y EPIDEMIOLOGICAS DE LA
HEPATITIS NO A - NO B Y LA HEPATITIS B**

Característica	Hepatitis B	Hepatitis noA-noB
Período de incubación	Alrededor de 50 a 70 días límite medio 50-150 días.	Alrededor de 49-91 días límite medio -- 50-180 días.
Tipo de inicio	Por lo general insidioso	Por lo general insidiosos
Cuadro agudo	Moderado a grave	Moderado
Grupo de edad	Todas las edades preferente niños y juvenes.	Todas las edades.
Pródromos: artritis, exantemas é ictericia.	Puede haber	No se sabe, pero hay manifestación de ictericia.
Transaminasa glutámica, oxaloacética sérica (SGOT) transaminasa glutámica pirúvica sérica -- (SGPT).	Anormales	Aumento prolongado, anormales.
Concentración de IgM	Se presenta	No se ha determinado
Virus en heces	Puede haber	No se sabe
Mortalidad	1-5% de los casos	1-3% de los casos.

**CUADRO 2-5 DIFERENCIAS INMUNOLOGICAS Y EPIDEMIOLOGICAS
DE LA HEPATITIS NO A - NO B Y LA HEPATITIS B**

Característica	Hepatitis B	Hepatitis noA-no B
Antígeno en sangre	Se encuentra en el período de - incubación y la fase aguda.	No existe
Virus en sangre	Existen, ocasionalmente persisten meses y años	Existen, ocasionalmente persisten meses y años.
Estado de portador	Existe	Existe
Cronicidad	10% de los casos	1-3% de los casos
Confirmación diagnóstica en suero	Se detecta el antígeno S de HBV	Por exclusión de HBV Y HAV.

Fuente: (60,61,62,63)

RELACION DE LA HEPATITIS B (HBV)
CON LA HEPATITIS DELTA (HDV)

En 1977 Mario Rizzeto describe un nuevo sistema antígeno-anticuerpo en el suero de pacientes con severos signos de hepatitis crónica tipo B (64); subsecuentemente varios estudios demostraron que el nuevo sistema antígeno-anticuerpo correspondía a un nuevo marcador de un virus, referido como el agente delta (HDV).

El virus delta, es un virus defectuoso ya que sólo puede replicarse en presencia y con ayuda del virus de hepatitis B, el cual proporciona el estado patológico propicio para que el virus delta se manifieste clínicamente; el uso de modelos experimentales, animales (chimpancés, comadreja), en los que se han creado infecciones a propósito han permitido hasta hoy la comprensión de algunas de las características del agente delta; el virus delta es un virus polimórfico envuelto, de 36 nm de diámetro, en el que ninguna de sus estructuras organizadas se parece a la cápsida del virus de la hepatitis B; el genoma del virus delta está formado por una sola trenza de RNA, en el que se han leído y secuenciado 9 estructuras (65), pero solamente se tienen bien descritas a dos proteínas una de 27 KD y otra de 29 KD (66), estas dos proteínas forman parte importante de la composición proteica interna del virus delta (o antígeno delta) (67).

La infección del virus de hepatitis delta, presenta un polimorfismo clínico, de manera que se puede presentar en dos circunstancias:

-Coinfección: se lleva a cabo por medio de una primo infección simultánea con virus B y virus D, se presenta en la forma común de la hepatitis B; en este tipo de infección el virus delta no incrementa el riesgo de una progresión de la hepatitis B hacia la cronicidad; la extinción de la replicación del virus de hepatitis B, induce al virus delta en la replicación; durante la fase inicial de la hepatitis delta, solamente se pueden detectar anticuerpos de tipo Ig M (anti-HBc) los que permiten diferenciar entre una coinfección (anti HBc positivo) y una super infección (anti-HBc negativo), ya que el antígeno delta solamente es transitorio (1 a 4 semanas) y es muy difícil de detectarlo, por este motivo se utilizan marcadores de la enfermedad como lo son los anti-HDV (anticuerpos contra el virus delta) los que tienen una permanencia de 3 meses en el caño de la coinfección.

El pronóstico de la coinfección es favorable ya que el antígeno -- HBs desaparece, curándose totalmente de la hepatitis B pero dificultándose la cura de la hepatitis delta; en contraste, la combinación de estos dos virus, incrementa el riesgo de una hepatitis fulminante y para dómicamente el pronóstico de una hepatitis fulminante debida a una coinfección, es de mejor pronóstico que si se trata de hepatitis tipo B solamente (68,69).

-Superinfección: la super infección es la interferencia del virus delta en la intensidad de replicación del virus de la hepatitis B, reduciendo los marcadores de la replicación del virus de la hepatitis B (HBc-Ag, HBV, DNA polimerasa) (70); en algunos casos esta interferencia no disminuye los niveles de HBs presentes en el sue-

ro del paciente, este tipo de infección se presenta como una primo infección en un sujeto que tiene una infección crónica de tipo B, generalmente causa un episodio de hepatitis aguda y ocasionalmente hepatitis fulminante, en la mayoría de los casos, indiferentemente de la forma clínica de la primo infección, el virus de la hepatitis delta mantiene su replicación, junto con el virus de la hepatitis B, el mismo enfermo progresa hacia la cronicidad, la agravación de la lesión es probablemente debido al efecto citopático directo del virus de hepatitis delta.

Como la hepatitis delta depende de la hepatitis B, las zonas donde se presenta son las mismas zonas endémicas del virus de hepatitis B, éstas son básicamente el Mediterraneo, América Latina, - Este de Europa (71), se presenta muy poco en Africa-Sahara y no se han reportado casos en Asia (72), en el Oeste de Europa y Norte América; el virus de la hepatitis delta prevalece, debido a - drogaditos y microepidemias mal tratadas en las que no se cuida la esterilidad de los productos sanguíneos, fuera de las poblaciones de riesgo a contraer hepatitis B, el resto de la población no corre ningún peligro de ser infectada por el virus delta (73) limitandose así la propagación del virus de hepatitis delta en la población (74).

C A P I T U L O I I I

I N T R O D U C C I O N

En la actualidad, gracias a que se conocen todos los marcadores antigénicos del virus de la hepatitis B, se ha podido detectar la presencia de enfermos y portadores, evitando así en cierto grado la propagación de esta enfermedad, la depuración de las técnicas para poder detectar los antígenos virales en los materiales biológicos provenientes del paciente ha venido a dejar atrás a muchos métodos rudimentarios y caros.

En esta forma, como los he dividido según su aparición dentro de la identificación del virus de la hepatitis B a través de los años.

Los métodos menos utilizados para identificar el antígeno de su superficie HBs-Ag son:

- 1).- Ouchterlony
- 2).- Contrainmunolectroforesis
- 3).- Aglutinación de látex
- 4).- Fijación de complemento
- 5).- Radioinmuno análisis
- 6).- Hemaglutinación
- 7).- Inhibición de la hemaglutinación
- 8).- Inmunofluorescencia.

Los métodos más utilizados en la actualidad son: Ensayos inmuno enzimáticos "ELISA" y detección de DNA por hibridación, estas técnicas son las más sensibles por que permiten detectar pequeñas cantidades de antígeno ó anticuerpos en diversos materiales biológicos; los métodos abordados en este trabajo seran descritos detalladamente más adelante (75).

OUCHTERLONY
(DOBLE DIFUSION EN AGAR)

Fundamento:

En esta técnica se realiza una inmunodifusión en dos dimensiones sobre una placa de agar en la que, tanto el antígeno como el anticuerpo se difunden en todas direcciones avanzando con una velocidad directamente proporcional a su concentración e inversamente proporcional a su peso molecular, al difundir y encontrarse en concentraciones equivalentes forman complejos unitarios estables que pueden ser detectados visualmente como una banda de precipitación; cuando se prueba un antígeno constituido por una mezcla de fracciones antigénicas frente a una mezcla de anticuerpos, se forman varias bandas de precipitación donde cada una de las bandas corresponde a una fracción antigénica diferente; se deja que esto ocurra a temperatura ambiente durante 24-48 hrs y al cabo de este tiempo se leen los resultados, para evitar que desarrollen contaminantes que puedan falsear los resultados, se coloca un papel filtro impregnado con fenol al 5%. (76)

La pequeña cantidad de muestra utilizada es la principal -- ventaja de esta prueba, apesar de ser la menos sensible y -- la más antigua todavía se sigue usando debido a que es muy fácil de llevar a cabo ya que no se requiere de equipo especial, sin embargo, lo importante de esta técnica es que la reacción antígeno-anticuerpo presente las líneas de identi-

dad bien definidas.

Las desventajas de esta técnica son: ser la menos sensible para detectar HBs Ag que otras técnicas, el tiempo en el que se tienen los resultados en largo, de igual manera si no se sella el pozo en donde se colocan las muestras, los reactivos difunden entre la capa de gel y el fondo del cubre objetos lo que falsearía los resultados, para no caer en errores de resultados en la identificación de bandas se deben de correr sueros controles previamente identificados también se ve afectado por algunas variantes como el ph - (77).

CONTRA INMUNOELECTROFORESIS
(CEF)

FUNDAMENTO:

Este método también es conocido como inmunolectroforesis por contracorriente, y electro precipitación, el método fue aplicado con gran éxito por Beadarida y colaboradores desde 1969 (78).

El principio básico del método implica la electroforesis en un medio de gel, en el que se encuentran dos pozos, en uno de ellos se coloca el suero del paciente, en el otro pozo se colocan los anticuerpos, la difusión no es radial ya que al forzarla con el campo eléctrico se obliga a que la difusión sea unidireccional concentrando así los reactivos y acelerando la reacción; el antígeno HBs-Ag a un pH alcalino se encuentra -- con carga negativa y migra hacia el ánodo, por el contrario -- los anticuerpos (gammaglobulinas) se encuentran cerca de su -- punto isoeléctrico y tienden a moverse hacia el cátodo por medio de las fuerzas electroosmóticas; esta fuerza resulta -- porque la capa de agar tiene una carga negativa en la superficie y al hacer pasar la corriente eléctrica, el agua del medio se polariza y se forman iones hidronio inestables en la superficie del agar, como la gammaglobulina (anticuerpos) tiene -- carga débilmente negativa , se une a los iones hidronio y estos se encargan de arrastrar a los anticuerpos hacia el cátodo (negativo) y el antígeno migra en sentido contrario y al encontrarse en su punto de equivalencia forman una ó varias

bandas de precipitación.

Este método posee mayor sensibilidad que el Ouchterlony (aproximadamente 10 veces más sensible), la especificidad de esta técnica, se debe a que la fuerza iónica del amortiguador es diferente a la fuerza iónica de la placa de agar, de tal manera que se induce la formación de iones.

La hemólisis moderada en los sueros produce interferencia en esta prueba y una contaminación microbiana puede reducir la sensibilidad del método; cuando modificamos el pH, los anticuerpos y el antígeno no migran si esto ocurre no se observa la zona de precipitación (79).

AGLUTINACION EN LATEX

(aglutinación reerva pasiva en látex)

FUNDAMENTO:

Las reacciones de aglutinación se manifiestan como grupos aglutinados de antígeno-anticuerpo, el antígeno en este sistema -- tiene la peculiar característica de ser de naturaleza forme en suspensión es decir es una célula ó partícula cuyos antígenos están en la superficie como propios ó han sido colocados ahí, en este caso se recubren partículas inertes con antígenos que normalmente no dan reacciones de aglutinación por si solos, el anticuerpo que participa es de tipo Ig M aunque otras inmunoglobulinas también pueden participar; las variantes que se presentan de esta técnica son: 1) la aglutinación directa, 2) aglutinación indirecta ó pasiva, 3) aglutinación reerva pasiva, en el primer caso la célula participa en la reacción de aglutinación utilizando los antígenos propios celulares, en la segunda reacción, a la partícula se le han colocado los antígenos sobre la superficie, en el tercer caso, en lugar de colocar el antígeno, se adsorben anticuerpos en la superficie de la partícula inerte(80).

En el método usado para el diagnóstico del antígeno HBs-Ag se utilizan las partículas de látex como portadoras pasivas de anticuerpos Anti-HBs adsorbidos sobre la superficie de la partícula inerte, (usualmente se usa IgG para ser adsorbida pasivamente en las partículas de látex), de está forma, al entrar en contacto con el suero del paciente reacciona con el HBs-Ag pre

AGLUTINACION EN LATEX
(aglutinación reerva pasiva en látex)

FUNDAMENTO:

Las reacciones de aglutinación se manifiestan como grupos aglutinados de antígeno-anticuerpo, el antígeno en este sistema -- tiene la peculiar característica de ser de naturaleza feroce en suspensión es decir es una célula ó partícula cuyos antígenos están en la superficie como propios ó han sido colocados ahí, en este caso se recubren partículas inertes con antígenos que normalmente no dan reacciones de aglutinación por si solos, el anticuerpo que participa es de tipo Ig M aunque otras inmunoglobulinas también pueden participar; las variantes que se presentan de esta técnica son: 1) la aglutinación directa, 2) aglutinación indirecta ó pasiva, 3) aglutinación reerva pasiva, en el primer caso la célula participa en la reacción de aglutinación utilizando los antígenos propios celulares, en la segunda reacción, a la partícula se le han colocado los antígenos sobre la superficie, en el tercer caso, en lugar de colocar el antígeno, se adsorben anticuerpos en la superficie de la partícula inerte(80).

En el método usado para el diagnóstico del antígeno HBs-Ag se utilizan las partículas de látex como portadoras pasivas de anticuerpos Anti-HBs adsorbidos sobre la superficie de la partícula inerte, (usualmente se usa IgG para ser adsorbida pasivamente en las partículas de látex), de está forma, al entrar en contacto con el suero del paciente reacciona con el HBs-Ag pre

sente, dando lugar a la reacción de aglutinación identificando de esta forma el antígeno marcador de la hepatitis B (81).

La sensibilidad de este método es igual al de la contra inmuno electroforesis, es un método rápido y sensible para detectar - el antígeno HBS; los resultados falsos positivos que se pueden presentar en este método están relacionados frecuentemente con sustancias parecidas al HBS-Ag que aglutinan con la globulinas que recubren las partículas de látex, los factores que pueden modificar la reacción de aglutinación son pH, la fuerza iónica y la concentración del antígeno.

HEMAGLUTINACION REVERSA PASIVA

FUNDAMENTO:

Cuando el antígeno feroce utilizando es un glóbulo rojo la aglutinación modifica su nombre y se le llama hemaglutinación (82).

La hemaglutinación reversa pasiva se utiliza para detectar los antígenos HBs-Ag, HBe-Ag, basandose en que los anticuerpos correspondientes cubren la superficie de los glóbulos rojos que han sido tratados con ácido tánico, los anticuerpos altamente purificados se unen a los glóbulos rojos de humano tipo "0", - de carnero, ó de pavo produciéndose una suspensión de células sensibilizadas, al ponerlas en contacto con sueros de pacientes son aglutinados los glóbulos rojos en presencia de los antígenos HBs-Ag, HBe-Ag formando acumulos de glóbulos rojos en forma de botón (83), está técnica constituyen uno de los métodos más sensibles que se han utilizado en el laboratorio con respecto a otros métodos, inclusive se ha señalado que es más sensible que el método de fijación de complemento y no existe el riesgo de dar resultados falsos positivos ó viceversa si se usan los controles adecuados.

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

FUNDAMENTO:

El principio de este análisis se basa en que el suero del paciente es incubado previamente con el antisuero que contiene los anticuerpos Anti-HBs, Anti-HBe ó de reacción cruzada; en el caso de existir antígenos HBs-Ag, HBe-Ag en el suero del paciente estos van a neutralizar a su correspondiente antisuero, (Anti-HBs, Anti-HBe), pero como no ocurre ninguna reacción visible es necesario agregar un sistema revelador constituido por glóbulos rojos recubiertos con antígenos HBs-Ag, HBe-Ag para ver si ocurrió la neutralización en cuyo caso no se produce la aglutinación.

Por el contrario si no hay antígenos en el suero del paciente, el antisuero quedará libre y al adicionar el sistema revelador se producirá la reacción de aglutinación (84,85).

FIJACION DE COMPLEMENTO

La técnica de fijación de complemento ha sido ampliamente aplicada tanto en la investigación como en el laboratorio clínico para detectar los antígenos y anticuerpos en la hepatitis B, esta técnica fue descrita al mismo tiempo por Shulman (86) y por Purcell (87), y para llevarse a cabo se necesita la presencia de complemento, usando un sistema indicador hemolítico, así la fijación del complemento ocurre durante la interacción del antígeno y el anticuerpo dependiendo de un sistema de reacción en dos etapas:

En la etapa inicial el antígeno y el anticuerpo reaccionan en presencia de una cantidad conocida de complemento, de esta forma es fijado el complemento, si no hay antígeno -- presente que reaccione con los anticuerpos, el complemento no es fijado y permanece libre en solución; en la segunda etapa, se investiga la presencia ó ausencia de complemento libre en solución por medio de un sistema hemolítico indicador para ver si se ha utilizado; este sistema hemolítico está formado por eritrocitos de carnero los cuales se encuentran recubiertos por su anticuerpo específico adsorbidos en la superficie por su fracción variable (F.V), (el anticuerpo específico se le llama hemolisina ó anboceptor hemolítico anticarnero) de esta forma el complemento libre se une a la fracción constante (F.C) de los anticuerpos, -

activando así al complemento por vía clásica llegando a formar el complejo llamado MAC (complejo de ataque a la membrana) de esta forma los eritrocitos de carnero son lisados por el complemento residual, por lo tanto existe una relación reciproca entre la cantidad de lisis en la segunda etapa y el antígeno presente en la primera etapa, expresando los resultados como la dilución más alta del suero que muestra fijación para la estimación de los anticuerpos.

La técnica es altamente sensible y útil para detectar el antígeno HBs-Ag y el anticuerpo anti-HBs, tiene ligeramente mayor sensibilidad que la contra inmunoelectroforesis, (88) sin embargo siempre que se utiliza esta técnica se deben correr controles adecuados que incluyen aquellos para los eritrocitos de carnero, el suero problema, el complemento; esta es sin duda una desventaja grande, ya que los resultados obtenidos sin tomar en cuenta esto estan fuera de toda veracidad y confiabilidad.

INMUNOFLUORECENCIA

FUNDAMENTO:

La técnica de la inmunofluorecencia fue introducida por Coons en 1941 (29), el cual empleaba Beta-antraceno como compuesto fluorecente de color azul, conjugado con una anti-gamma globulina (anti-suero).

La fluorecencia es esencialmente una técnica histoquímica ó citoquímica; sin embargo se ha utilizado para la detección e identificación de antígenos y anticuerpos en los padecimientos de hepatitis B, en esta técnica el anticuerpo específico es conjugado con los compuestos fluorecentes resultado así un -- marcador sensible con reactividad inmunitaria inalterada, esto se debe a que los anticuerpos unidos al compuesto fluorecente son inmunoglobulinas específicas que ha sido marcadas; los colorantes fluorecentes más utilizados son la rodamina, auramina, etc; las cuales fluorecen al ser expuestas a la luz ultra violeta; el conjugado (la gammaglobulina marcada) se pone en contacto con el antígeno con el cual forma un complejo unitario estable de antígeno-anticuerpo, los anticuerpos que no reaccionan son eliminados mediante lavados, cuando se observan los antígenos bajo un microscopio de fluorecencia contra un fondo oscuro, los antígenos fijados a los anticuerpos fluorecentes pueden ser descubiertos en virtud de su brillantes; de ahí su gran utilidad para detectar la hepatitis B.

De está técnica existen dos variantes:

Inmunofluorecencia directa

En esta variante del método, el antígeno viral, se le fija en un porta objetos en forma de una mono capa, al cual se le pone en contacto con el anticuerpo (suero anti-antígeno) marcado con fluoreceina, se incuba de 10 a 15 min tiempo después - se eliminan los anticuerpos marcados que no reaccionaron por medio de lavados el porta objetos se inspecciona microscópicamente usando una fuente de luz ultra violeta, de la cual toda ha sido filtrada menos la de longitud de onda corta, de esta forma la muestra antigénica se presenta brillante en aquellas áreas donde se encuentren los anticuerpos marcados emitiendo una luz amarilla verdosa (90).

Inmunofluorecencia indirecta

Esta técnica difiere de la anterior en que el anticuerpo que se une al antígeno fijado en un porta objetos no está marcado con fluoreceina; una vez llevado a cabo la reacción arriba descrita, se agrega un anticuerpo anti gamma globulina marcado - con fluoreceina, este anticuerpo reacciona con la fracción -- constante del primer anticuerpo agregado que se encuentra unido al antígeno. Posteriormente se efectúan lavados con el objeto de eliminar lo que no reacciona y finalmente se observa al microscopio de luz ultra violeta.

La utilización de antígeno HBs-Ag y anticuerpos Anti-HBs facilitan la identificación del virus de la hepatitis B (91), esta

técnica se utiliza para localizar el antígeno HBs-Ag en el citoplasma infectado de los hepatocitos en biopsias de hígado; la sensibilidad del método y la aplicación son variables, ya que es un método caro por el tipo de instrumentación requerida y -- los marcadores utilizados para desarrollar la fluorescencia.

RADIO INMUNOANALISIS

La meta principal de este tipo de valoración es de terminar la concentración de las moléculas de interés en la hepatitis B - (HBs-Ag), un hecho común que se repite en todos los métodos de valoración de ligandos es la reacción del antígeno con un anticuerpo, en esta técnica uno de los dos principales reactivos - es marcado con un isótopo radiactivo de Iodo 125-135 de manera que puede seguirse mediante procedimientos específicos como - la autorradiografía, el conteo con espectrómetro, contador de centelleo líquido para emisiones alfa ó beta, la reacción de - radio inmuno valoración se lleva a cabo en tres etapas: (92).

1.- Reacción antígeno anticuerpo

En esta etapa se establecen varios pozos de reacción, conteniendo en cada uno de ellos una pequeña concentración fija de antígeno marcado con iodo y antígeno libre, éste último se agrega en concentración conocida se les pone en contacto con los anticuerpos de tal forma que el fenómeno central aquí es la competencia fisicoquímica de los antígenos por el sitio de unión del anticuerpo (este último antígeno libre puede ser un estándar ó un suero problema), según el grado en que se lleve la reacción química entre el anticuerpo y los antígenos se dice que la valoración es de equilibrio (completa) ó desequilibrio (incompleta) (93).

2).- Separación

La fracción unida y libre son separadas por métodos físicos relacionados con los anticuerpos los cuales incluyen precipita--

ción salina utilizando sulfato de amonio; desnaturalización por medio de solventes como metanol, etanol, acetona, polietilenglicol ó por medio de un segundo anticuerpo dirigido contra el primero inmovilización de anticuerpos a una fase solida ó observar el antígeno marcado con celulosa ó sefadex, carbón activado etc.

3).- Medición de la respuesta

En este paso se realiza el conteo de la radiación, dependiendo del tipo de radiación emitida por el antígeno marcado se utiliza un contador de centelleo líquido para emisiones alfa ó beta, al igual puede ser usado un contador gama de cristal sólido para emisiones gama, a la medición ó valor computado se le conoce como respuesta, sin embargo para establecer una relación entre la concentración del problema (standar) y la respuesta a la valoración se utilizan curvas de calibración donde se relacionan la emisión contra el logaritmo de la concentración.

Para que todo lo anteriormente expuesto se cumpla es indispensable que uno de los reactivos antígeno ó anticuerpos se encuentre en forma pura, y de igual manera el grado de iodación debe de conservarse en niveles bajos ya que de otra manera se puede llegar a cambiar las propiedades de la proteína y esto es una desventaja por lo que lo hace ser un método caro y peligroso si no se manipula adecuadamente, la ventaja que presenta es que es un método sensible, confiable, y específico, con respecto a todos los métodos mencionados para detectar el antígeno HBs-Ag (94).

TECNICAS DE HIBRIDACION DEL DNA

FUNDAMENTO:

Existe una técnica denominada de "transferencia hibridación" hoy de uso común en los laboratorios de biología molecular, - permite detectar entre distintos fragmentos de DNA del virus de hepatitis B, si uno de ellos es el complemento exacto de otro fragmento dado de DNA; esta técnica nos permite detectar la presencia de DNA vírico en las células hepáticas y precisar si esta presente en forma libre ó en forma integrada, es decir incorporado al genoma celular (95).

El principio de esta técnica de transferencia hidridación es el siguiente; el DNA es extraido de las células hepáticas ó de la sangre, éste es sometido a una digestión con enzimas de restricción que lo dejan reducido a numerosos fragmentos que son colocados sobre un gel de agarosa, posteriormente se aplica un campo eléctrico; la mayoría de los fragmentos migran hacia el polo positivo (en función de su tamaño ya que a menor tamaño mayor velocidad y visceversa).

Los fragmentos de DNA separados se transfieren a una hoja de nitrocelulosa, (en la que se lleva acabo un fenómeno de bombeo análogo al de una hoja secante), la última etapa de la operación consiste en ver en que punto de la hoja de nitrocelulosa se encuentran los fragmentos de DNA que contienen secuencias del DNA del virus de la hepatitis B, lo cual se consigue por el apareamiento ó "hibridación" a una sonda radiactiva constituida por el genoma del virus de hepatitis B --

(la sonda está constituida por DNA del genoma vírico el cual se obtiene en grandes cantidades después de la clonación de la bacteria conocida como (Escherichia coli), con los fragmentos de DNA celular que poseen una parte ó la totalidad de las secuencias de dicho genoma vírico, tanto la sonda como los fragmentos de DNA son reducidos a un estado de filamento único, posteriormente se aplica una película fotográfica sobre la hoja de nitrocelulosa en la que la hibridación se manifiesta con la presencia de bandas negras analogo a lo que se hace en autoradiografía (96,97).

ENSAYO INMUNOENZIMATICO (EIA)

La técnica de EIA fue descrita en 1971 en Suecia por Engvall y Perlmann, y en Holanda por Van Weemen y Suchuurs (98).

Esta técnica es un inmuno ensayo que permite determinar la concentración de un antígeno ó un anticuerpo, se fundamenta en fijar el antígeno ó el anticuerpo a una fase sólida, posteriormente se le agrega la muestra problema, en una segunda instancia se agrega un anticuerpo acoplado a una enzima para finalmente revelar el sistema mediante la adición de un sustrato específico, que pasa de una forma incolora a una forma colorida; la intensidad de color producido es directamente proporcional a la cantidad de antígeno ó anticuerpo presente en la muestra y puede ser medido espectrofotométricamente (99).

El método más común mente utilizado es el método heterogeneo en donde el antígeno ó el anticuerpo se fija a una fase sólida para facilitar la separación de los reactivos libres y combinados, en la que se captan los complejos que se van formando, son métodos que generalmente se llevan acabo en varios pasos y pueden llevarse de 2 a 6 hrs., sin embargo son los métodos que se han adoptado de rutina para diagnóstico de hepatitis B en los laboratorios; las variantes del método heterogeneo son : (100).

- Método indirecto

El método es ampliamente usado para detectar anticuerpos Anti-HBc, Anti-HBs, que se presentan durante la hepatitis B,

la técnica es la siguiente:

- 1).- En las placas de poliestireno se fija el antígeno a la fase sólida.
- 2).- La muestra a ensayar (suero) se incuba con el antígeno no se incuba y se lava la placa el anticuerpo presente reacciona con el antígeno inmovilizado en la superficie de la placa de poliestireno.
- 3).- Se agrega una anti-gammaglobulina humana marcada con enzima se incuba en la placa, este reacciona con cualquier anticuerpo por su fracción constante (F.C) capturado en el paso # 2 el exceso de reactivo se lava.
- 4).- Se añade el sustrato para la enzima (se incuba), la velocidad de degradación se indica por el cambio de color que es directamente proporcional a la concentración de los anticuerpos de la muestra del paso # 2.
- 5).- Se detiene la reacción (desnaturalizando la enzima), el color se detecta visualmente ó con un espectrofotómetro -- (fig. 3.4) (101).

- Método del sandwich

Por medio de este método se identifican los antígenos HBe-Ag, HBs-Ag que se presentan durante la hepatitis B, la técnica es la siguiente:

- 1).- Se absorben los anticuerpos específicos sobre la fase sólida.
- 2).- Se coloca la muestra problema en donde se encuentra el antígeno que buscamos el cual reacciona con los anticuerpos adsorbidos en la fase sólida, incubamos y se lava .

3).- Se agrega un segundo anticuerpo específico marcado con una enzima, el cual esta dirigido contra otra determinante antigénica diferente a la que reconoce el primer anticuerpo, se incuba y se lava.

4).- Se le adiciona el sustrato para la enzima, el desarrollo de color es proporcional a la cantidad de antígeno presente.

5).- Se detiene la reacción y el color se determina con espectrofotómetro (fig 3.5) (101).

- Método competitivo

El método competitivo se utiliza para poder detectar anticuerpos Anti-HBc, Anti-HBs, Anti-HBe ó antígenos HBs y HBe.

1).- El anticuerpo ó el antígeno se fija a la fase sólida.

2).- Un conjugado de antígeno (ó anticuerpo) marcado con una enzima se mezcla con la muestra que contiene presuntamente antígeno (ó anticuerpo) se incuba y se lava.

3).- Se añade el sustrato para la enzima, la diferencia en la degradación del sustrato entre el conjugado solo y el conjugado más la muestra ensayada, es proporcional a la cantidad de antígeno (ó anticuerpo) de la misma (fig. 3.6)(102).

-Método de Anti Ig M (HBc) se utiliza para detectar a la Ig M cuando en la enfermedad de hepatitis B, está en sus fases iniciales ya que esta inmunoglobulina es la que primero aumenta sus niveles.

1).- La fase sólida se reviste con un anticuerpo específico anti- Ig M.

2).- El suero ensayado se incuba con la fase sólida sensibilizada, que se lava luego.

3).- Se añade entonces antígenos marcado con enzima (ó antígeno seguido de anticuerpos específico marcado con enzima).

4).- Se añade sustrato enzimático, la degradación del sustrato es proporcional a la cantidad de anticuerpo Ig M del suero analizado (fig. 3.7) (102).

- Prueba de confirmación por inhibición

Este método se utiliza como prueba de confirmación para diagnosticar la enfermedad de la hepatitis B.

1).- Se absorben los anticuerpos anti-HBs sobre la fase sólida.

2).- Se coloca el suero problema en donde se encuentra el antígeno que buscamos el cual reacciona con los anticuerpos absorbidos en la fase sólida, incubamos y se lava.

3).- Se agrega un segundo anticuerpo específico marcado con una enzima, el cual esta dirigido contra otra determinante antigénica diferente a la que reconoce el primer anticuerpo, se incuba y se lava.

4).- Se le adiciona el sustrato para la enzima, y se calcula la densidad óptica.

5).- El suero problema se incuba con anticuerpos neutralizantes Anti-HBs, los cuales saturan las determinantes antigénicas.

6).- Se sigue los pasos 2, 3, 4 .

7).- La reducción de el 50% ó más de la densidad óptica obtenida en el primer caso se considera positivo y por lo tanto, se confirman los resultados iniciales (fig. 3.8) (103).

FIG 3.4

METODO INDIRECTO

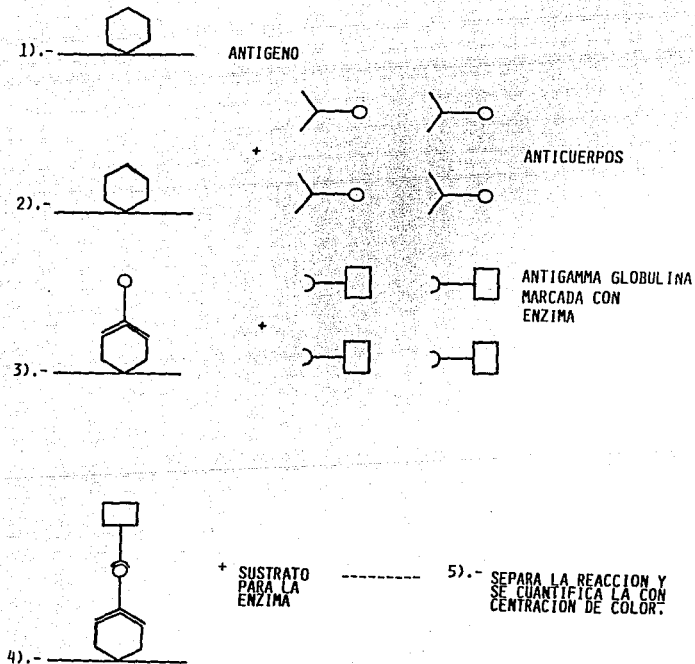


FIG. 3.5

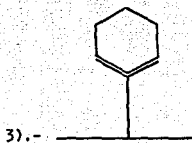
METODO SANDWICH



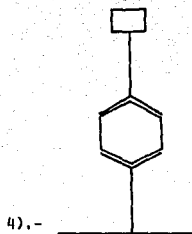
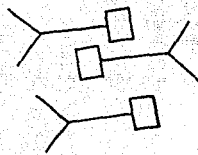
ANTICUERPO



ANTIGENOS



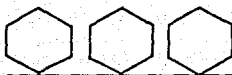
ANTICUERPOS
MARCADOS
CON ENZIMA.



+ SUSTRATO PARA LA ENZIMA

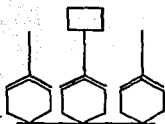
5).- HAY DESARROLLO DE COLOR Y SE CUANTIFICA LA CONCENTRACION DE COLOR.

1).-



ANTIGENO

2).-

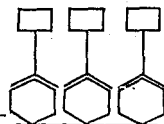


SE AÑADE ANTICUERPOS
MARCADO CON ENZIMA MAS
ANTICUERPOS DESCONOCIDOS

SUSTRATO PARA LA ENZIMA
(3.6 A)

HAY DESARROLLO DE COLOR
SE PARA LA REACCION

2).-



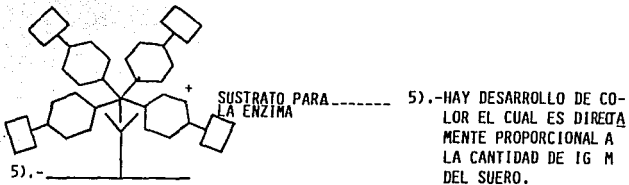
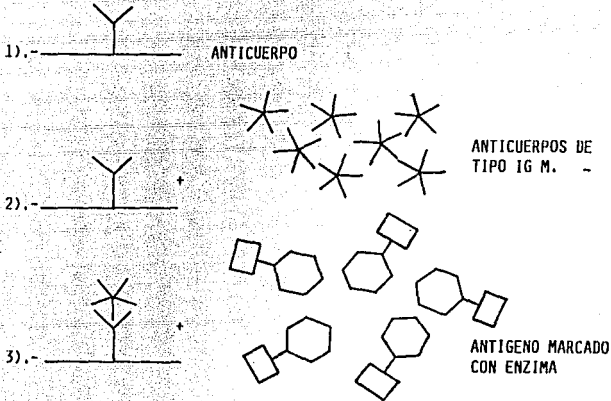
ANTIGENO MARCADO CON
ENZIMA SIN SUERO PRO
BLEMA.

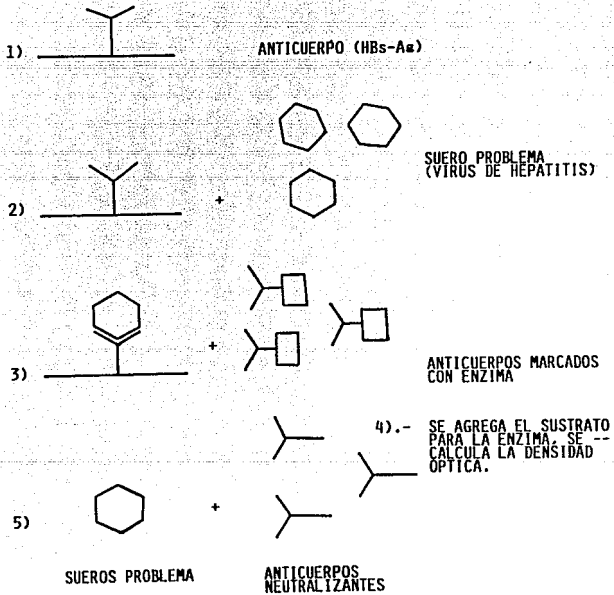
SUSTRATO PARA LA ENZIMA
(3.6 B)

HAY DESARROLLO DE CO
LOR SE PARA LA REAC
CION.

LA DIFERENCIA ENTRE 3.6 A Y 3.6 B NOS DA LA CANTIDAD DE ANTICUERPOS DES-
CONOCIDO PRESENTE EN LA MUESTRA DESCONOCIDA

METODO DE ANTI- I G M





6) SE SIGUEN LOS PASOS 2,3,4 Y SE COMPARAN LAS DENSIDADES OPTICAS.

CAPITULO IV

I N T R O D U C C I O N

El control de la hepatitis B depende de la posibilidad de disponer y utilizar en forma adecuada uno ó más procedimientos - que ayuden a implementar las medidas generales que interrumpen la cadena de transmisión del virus de la hepatitis B; estas - medidas generales constituyen una guía para quienes viven ó trabajan en lugares donde hay un riesgo alto de infección por virus B; las medidas generales empleadas son:

- 1).- Higiene personal
- 2).- Desinfección y esterilización de fomites
- 3).- Información y educación sobre el antígeno de superficie de el virus de hepatitis B (HBs-Ag).
- 4).- Reducir al mínimo el contacto personal estrecho entre - personas sanas y enfermas etc. (104, 105).

Sin embargo estas medidas por si solas no bastan, por lo que los procedimientos empleados para tratar de erradicar el problema son; la inasunización pasiva y la inasunización activa.

La inasunización pasiva se basa en el uso exclusivo de inmuno globulinas inmediatamente después de una exposición conocida, pero los intentos iniciales de su utilización como medida -- profiláctica de la hepatitis B, ha demostrado através de los años que este material tiene muy poca utilidad en la protección contra la enfermedad.

A raíz de esté problema se penso en desarrollar un sistema que confiriera una protección a largo plazo, apesar del fracaso - para cultivar el virus de la hepatitis B en condiciones in vi tro (106).

INMUNIZACION ACTIVA

La imposibilidad hasta ahora para cultivar el virus de hepatitis B ha obligado a que se utilice el plasma de portadores crónicos sanos que llegan a tener 10^{13} partículas de antígeno de superficie del virus B por ml. (107) como fuente de materia prima, este tipo de material requiere que todas las proteínas no relacionadas se eliminen, y los virus presentes en la solución se inactiven completamente para poder garantizar su aplicación; esto lo comunicó por primera vez Krugman y Giles en 1970 (108).

En 1972-1974 Alter, Barker, Hollinger (109) demostraron la protección completa que ofrecía esta nueva vacuna provada en primates, quienes después de la inmunización tenían niveles elevados de anticuerpos contra el HBs-Ag.

Dentro de este tipo de vacunas encontramos la de Hilleman y col. (110), y la de Maupas y col. llamada "Hevac B" (111) estos dos tipos de vacunas son las que se han utilizado en los últimos años para tratar de prevenir la hepatitis B; la vacuna que mayor número de resultados favorables ha tenido es la de Maupas, la que está -- siendo desplazada por la vacuna "Gen Havac B", distribuida por el Instituto Pasteur en Francia.

La vacuna de Maupas y col. "Hevac B", está constituida por partículas víricas no infecciosas que no son otra cosa más que envolturas portadoras del antígeno de superficie (HBs-Ag) las que son extraídas de la sangre de los portadores crónicos "sanos", dichas proteínas son aisladas por medio de una técnica llamada cromatografía por afinidad.

Los antígenos de superficie son absorbidos a través de la columna, se lava para eliminar las proteínas que no fueron absorbidas; el antígeno purificado se desprende del anticuerpo de la columna al eluir tiocianato sódico 3M, la preparación final se inactiva con formol 1:1000 durante 48 hrs. a 37°C y una semana a 4°C, se ajusta a 10mg. de proteína por ml. de solución conteniendo los subtipos ad/ay en la misma proporción.

Se le agrega hidróxido de aluminio como coadyuvante al 0.1% (112); la eficiencia de este tipo de vacuna así como su inocuidad están plenamente comprobadas a través de un período de obtención de datos de más de 10 años (113) y un número considerable de personas vacunadas, lo cual también han podido ser demostrado en la vacunación sistemática de niños en regiones endémicas como Senegal (114), en las que los niños menores de 2 años vacunados mostraron una respuesta inmunitaria elevada cuando entraban en contacto con el virus B, lo mismo se observó en las poblaciones de alto riesgo, en regiones no endémicas; sin embargo Crossier y col. demostraron que la eficiencia de la vacuna no era muy buena cuando se le administraba a personas hemodializadas probablemente a causa de una menor capacidad de respuesta inmunológica.

Las vacunas de Hilleman y col se obtiene de una mezcla de plasma de donadores de portadores crónicos, en donde la proporción de los tipos ad/ay es de 89/11, el método de extracción y separación es el mismo que se ha mencionado en la vacuna Francesa; el tratamiento de inactividad es con pepsina y formol, se le pone alumbre como coadyuvante y se ajusta a 20mg/ml (115), --

Szemunes y col (116) demostraron que la vacuna de Hilleman, provocaba alteraciones en las personas a las que les fue aplicada (homosexuales masculinos), estas alteraciones son: eritema local dolor en el sitio de la aplicación, febrículas, náuseas, vómito.- Por los efectos secundarios mostrados es que la vacuna no se ha producido a gran escala.

A pesar de los buenos resultados obtenidos con la "Hevac B", se hizo necesario encontrar otro procedimiento de fabricación ya - que en poco tiempo fue obvio que los portadores crónicos de antígeno de superficie (HBs-Ag) no constituyeron suministros adecuados de antígeno para la producción de la vacuna "Havac B" -- (117).

VACUNA GEN HEVAC B

El análisis completo de las estructuras genéticas S y Pre S2 (HBs-Ag), demostraron ser capaces de inducir una respuesta inmune protectora contra el virus de hepatitis B, esto ha permitido el desarrollo de la nueva vacuna "Gen Hevac B" desarrollada por Maupas y col. en el Instituto Pasteur (118, - 119), el desarrollo de esta nueva vacuna comprende algunas etapas importantes durante su fabricación dentro de ellas destaca la fase de clonación, en la que los genes correspondientes a las determinantes antigénicas capaces de inducir una respuesta inmune protectora, están integrados a un vector de expresión general llamado plásmido, este plásmido es introducido en una célula huésped la cual es capaz de transformar la nueva información genética, que conduce finalmente a la expresión de una molécula recombinante que conserva sus propiedades de antigenicidad e inmunogenicidad.

Una expresión correcta de la información genética depende de los procesos genéticos de transcripción y traducción las cuales forman parte importante de la formación de la molécula recombinante sintetizada por la célula huésped, los procesos postraduccionales son fundamentales ya que le confiere a la molécula sintetizada sus propiedades antigénicas e inmunogénicas, estas condiciones también dependen de la estabilidad de la molécula sintetizada, de su glicosilación de los residuos de aminoácidos de la molécula y de su estructura conformacional; así que las modificaciones postraduccionales son fun

nión de la célula huésped, la cual depende del medio de cultivo en el que se encuentra; las células huésped que se han utilizado han sido Escherichia coli y Saccharomyces cerevisiae (120, - 121), y células CHO (ovario de Hamster Chino), de estas tres células utilizadas la E. Coli y la S. Cerevisiae se descartaron por que la proteína sintetizada no estaba glicosilada y carecía de algunos aminoácidos (122,123), en la cadena de la proteína, las células CHO se empezaron a utilizar ya que se obtuvo la proteína recombinante completa y glicosilada, y como es lógico la glicosilación contribuye a la inmunogenicidad de ahí su utilización en la fabricación de la nueva vacuna "Gen Hevac B".

Además estas células se encargan de retener permanentemente la expresión de la proteína sintetizada y glicosilada, la cual es más estable y directamente excretada en forma particular en el medio de cultivo de las células, las partículas excretadas son estructuras tridimensionales idénticas a las partículas plásmáticas humanas naturales (124,125).

El vector utilizado para la transformación de estas células es un plásmido que porta principalmente dos unidades de transcripción (126, 127), el gen del antígeno de superficie HBS-Ag porta las secuencias S y Pre S2 esta última esta insertada en el material genético del plásmido siendo este el que le da la mayor ventaja a la nueva vacuna (la cual puede hacer que los linfocitos B lleven a cabo la secreción de anticuerpos neutralizantes), el mismo gen codifica para la dihidrofolato reductasa (DHFR) la cual permite obtener las líneas celulares dihidrofolato reductasa positivas (DHFR+), estas últimas células se caracterizan por sintetizar permanentemente el antígeno de superficie S.

la fabricación de la nueva vacuna Gen Hevac B comienza con la introducción del vector dentro de las células CHO dihidrofolato reductasa negativa, el gen S integrado al plásmido expresa la información contenida derivando a las células en dihidrofolato reductasa positiva (DHFR+), como una nueva clona, que se ha seleccionado gracias a sus propiedades de resistir altas concentraciones de méthotrexate ya que el gen del antígeno S es aplicado al plásmido en elevadas concentraciones de méthotrexate lo que permite al gen llevar acabo una mejor amplificación (128,129), las células en estas condiciones son cultivadas en fermentadores, en donde tres ó cuatro días después de iniciado el cultivo en el medio de cultivo se encuentran las proteínas sintetizadas; una vez que el medio de cultivo ha sido cambiado se lleva acabo la recolección del antígeno S en bruto, durante esta recolección se realiza la purificación del antígeno mediante:

- Ultracentrifugación; elimina las partículas retrovirales y las células madre.
- Fragmentación con polietilenglicol; elimina las partículas virales y celulares.
- Centrifugación zonal; separa las partículas según su tamaño y los virus de coeficiente de sedimentación elevado.
- Ultra centrifugación isopícnica; separa las proteínas según su densidad, eliminando principalmente el DNA residual y la albúmina bovina.

Las partículas del antígeno S purificadas son inactivadas por calor y por el tratamiento con formol, de esta forma el antígeno S queda purificado e inactivado, el siguiente paso es v

rificar que no haya DNA viral en la proteína sintetizada ya - que a pesar de las etapas de purificación para tratar de eliminar el DNA, se presenta una concentración inferior a los -- 10^{-3} picogramos, esta concentración esta por abajo de los niveles recomendados por la O.M.S.

El material sintetizado y purificado esta constituido por partículas de antígeno S de superficie de 22 nm, la estructura - de estas partículas obtenidas en las células CHO son idénticas a las partículas antigénicas de origen humano sin embargo, a diferencia de las partículas antigénicas humanas, la cantidad de Pre S2 es mucho mayor en el material sintético, la etapa final de la fabricación es la misma forma farmacéutica, el antígeno se diluye y se absorbe en hidróxido de aluminio hasta obtener una dosis vacunante de 20 microgramos de antígeno de superficie (130,131).

CAPITULO V

INTRODUCCION

La hepatitis es una afección cuya frecuencia refleja los factores sociales, y conductuales del desarrollo humano; - actualmente la hepatitis B es una de las enfermedades infecciosas con una etiología de las más severas, constituyéndose así en uno de los principales problemas sanitarios.

Ante tal situación el Instituto de Epidemiología de la Secretaría de Salud, desarrollo el sistema de cobertura universal de los servicios de salud, para obtener información acerca de los casos de hepatitis B ocurridos en nuestro país, dentro de cada una de las entidades federativas y municipios de la República Mexicana; (132) la metodología propuesta para analizar la frecuencia de la hepatitis B a nivel nacional fue la siguiente: (133, 134).

Metodología del estudio epidemiológico:

- a).- Identificar los casos de hepatitis B y buscar la causa; es decir, la probable fuente de origen así como el mecanismo de transmisión.
- b).- Indicar la magnitud del problema en la población, indicando si se trata de un caso esporádico ó de un brote epidémico y endémico, cuáles son los grupos de población afectada por sexo, edad, actividad.
- c).- Ubicar el problema en tiempo y espacio, según la estación del año, los días, los meses y la zona afectada.

- d).- Precisar las condiciones que favorecen la presentación de la infección del virus de hepatitis B.
- e).- Establecer un programa de actividades para controlar el problema.

La investigación se realizó con apego a las recomendaciones de la O.M.S. y con base en la metodología anteriormente mencionada; de manera que el Instituto de Epidemiología se encargó de girar las formas " SS-EPI-I-85 " en la cual, los servicios de salud local y regional de las entidades federativas de la República Mexicana se comprometen a anotar los casos de hepatitis B confirmados por diagnóstico de laboratorio clínico, durante el período comprendido entre los años 1989 - 1990.

**Incidencia de cifras epidemiológicas en México
durante los años 1989-1990**

Los resultados que a continuación se presentan son descriptivos del problema sanitario que actualmente enfrenta el país con respecto a la hepatitis B.

Las tablas 5-1, 5-2 muestran el número de casos declarados de hepatitis B en la República Mexicana, durante el año de 1989 hasta agosto de 1990; la estadística durante el año de 1989 (135,136, 137,138,139,140,141,142,143).

Tablas 5-1 indican un total de 135,836 casos de hepatitis B con un incremento de 13.6% de el mes de enero al mes de diciembre - del mismo año, la mayor tasa de incidencia la observamos en el mes de diciembre con 15%, el segundo mes con mayor incidencia - fué noviembre con 14.0%, el resto del año tuvo porcentajes por abajo del 12.6% (Tabla 5-4) ; en mayor número de casos de hepatitis los reporto el Distrito Federal con 21.0% de casos, encabezando el primer lugar en incidencia de hepatitis B, el segundo lugar lo ocupo el Estado de Veracruz con un total de 10% de casos, el tercero el Estado de México con 9.6% de casos reportados, el cuarto lugar en incidencia fué ocupado por el Estado de Jalisco con 5.6% de casos reportados, el quinto lugar lo ocupó el Estado de Tamaulipas con 5.4% de casos reportados, el sexto lugar lo ocupo el Estado de Chihuahua con 5.3% de casos reportados, el séptimo lugar lo ocupó el Estado de Nuevo León con 4.9% de casos reportados; todos los estados restantes tienen un número de casos de hepatitis B reportados menor al 4.9% (G-89,Tabla 5-3).

De acuerdo a los datos publicados por el Instituto Pasteur (144), durante el año de 1989 se presentó una mediana endemicidad en la República Mexicana del 2% al 7%, en cuanto a portadores cró-

nicos del antígeno de superficie HBs; demostrando así que el 20% de la población total ha desarrollado anticuerpos - contra el virus de hepatitis B.

TABLA 5-1

(Número de casos de hepatitis B notificados por entidad federativa durante el año de 1985 .)

ESTADOS	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO	SEPTIEMBRE	OCTUBRE	NOVIEMBRE	DICIEMBRE
AGUASCALIENTES	6	20	25	29	29	33	4	50	67	80	99	105
B. C. NORTE	45	113	147	175	198	222	247	283	307	350	427	505
B. C. SUR	19	36	48	63	85	103	112	130	156	187	236	259
CAKPECHE	6	12	18	25	28	29	30	35	39	44	49	50
COAHUILA	57	104	138	170	204	230	267	311	330	362	425	445
COLIMA	25	50	71	82	90	95	102	112	138	170	190	198
CHIAPAS	55	101	148	201	257	292	340	417	453	494	342	565
CHIHUAHUA	133	194	255	290	378	351	374	3185	441	495	574	629
LÍSTRITO FEDERAL	420	479	1474	1826	2215	2525	2789	123	3517	3953	4290	4510
GUERRERO	17	34	47	64	82	95	102	225	145	203	552	268
GUANAJUATO	49	70	108	122	156	176	195	408	291	332	392	407
HIDALGO	26	45	67	85	106	123	145	160	180	206	228	239
JALISCO	54	112	311	440	499	543	571	616	667	700	760	793
JALISCO	126	237	337	410	499	572	572	723	810	965	1137	1711
MEXICO	174	404	566	706	864	1003	1240	1295	1487	1615	1793	1911
MICHOACAN	70	130	199	259	319	373	412	488	557	625	700	763
MORELOS	12	29	41	54	64	77	96	111	128	148	168	184
MORELOS	8	20	36	48	65	84	89	104	125	137	160	176
NAYARIT	177	196	306	368	458	512	579	664	729	806	930	1030
NUÉVO LEÓN	16	36	51	75	104	142	169	202	238	300	332	350
OAXACA	69	139	193	236	264	295	325	359	392	433	466	479
QUERÉTARO	15	32	55	65	78	88	92	114	121	126	157	178
QUINTANA ROO	9	16	32	45	64	76	95	114	134	146	164	189
SAN LUIS POTOSÍ	50	115	159	191	232	258	278	306	329	366	398	421
SINALOA	16	67	70	74	83	94	112	126	151	189	220	236
SONORA	43	64	93	104	130	154	176	192	215	244	283	312
TABASCO	18	34	58	73	102	109	122	149	169	181	205	239
TAMAULIPAS	91	207	350	416	504	621	702	788	801	930	926	1024
TLAXCALA	2	10	16	22	30	40	45	59	67	82	86	88
VERACRUZ	110	212	354	465	671	1191	1311	1507	1691	1868	2063	2174
YUCATAN	28	50	69	90	106	128	147	171	187	199	237	255
ZACATECAS	15	29	39	44	51	55	69	83	164	112	151	161
TOTAL DE CASOS POR MES	1904	5881	7372	7316	8965	10689	11909	13610	15226	17048	19140	20356

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

TABLA 5-2
"AÑO 1990"
(Número de casos de hepatitis B notificados por entidad federativa durante el año de 1990.)

ESTADOS	ENERO	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO	JUNIO	JULIO	AGOSTO
AGUASCALIENTES	36	47	60	70	79	88	98	115
B. C. NORTE	65	95	139	179	221	276	351	418
B. C. SUR	29	49	77	98	119	135	158	178
CAJEME	4	8	17	23	25	29	36	38
COAHUILA	37	69	99	128	173	226	282	406
COLIMA	28	55	64	73	92	110	131	145
CHIHUAHUA	33	64	97	131	171	243	302	368
CHIHUAHUA	99	103	141	171	201	227	237	265
DISTRITO FEDERAL	319	745	1049	1332	1726	2036	2369	2796
DURANGO	54	77	96	125	136	160	164	197
GUANAJUATO	42	60	27	85	144	167	192	234
GUERRERO	20	38	59	84	116	139	161	245
HIDALGO	45	98	175	157	204	244	284	333
JALISCO	95	181	260	315	408	492	583	770
NEAJCO	163	351	533	642	808	943	1139	1343
MICHOACAN	76	126	169	203	258	306	381	455
MORELOS	14	22	36	49	76	88	107	155
NAYARIT	25	41	61	80	102	111	131	164
NUEVO LEON	127	193	251	293	403	505	613	805
OAXACA	25	55	68	82	128	165	189	236
PUEBLA	92	126	174	192	214	246	291	357
QUERETARO	19	36	63	83	109	127	165	209
QUINTANA ROO	8	30	50	63	74	81	92	109
SAN LUIS POTOSI	94	124	143	153	186	215	251	327
SINALOA	19	46	64	76	90	121	145	170
SONORA	19	44	68	145	174	219	275	350
TABASCO	19	38	65	74	92	105	112	142
TAMAULIPAS	51	86	145	178	247	377	472	646
TLAXCALA	5	11	17	151	52	63	81	77
VERACRUZ	162	286	429	553	694	868	1076	1290
YUCATAN	24	49	60	74	89	100	107	132
ZACATECAS	7	15	28	34	46	53	62	71
TOTAL DE CASOS POR MES .	1815	3368	4734	5996	7657	9255	10987	13546

Tabla 5-3

(Porcentaje por estado durante los años 1989-1990)

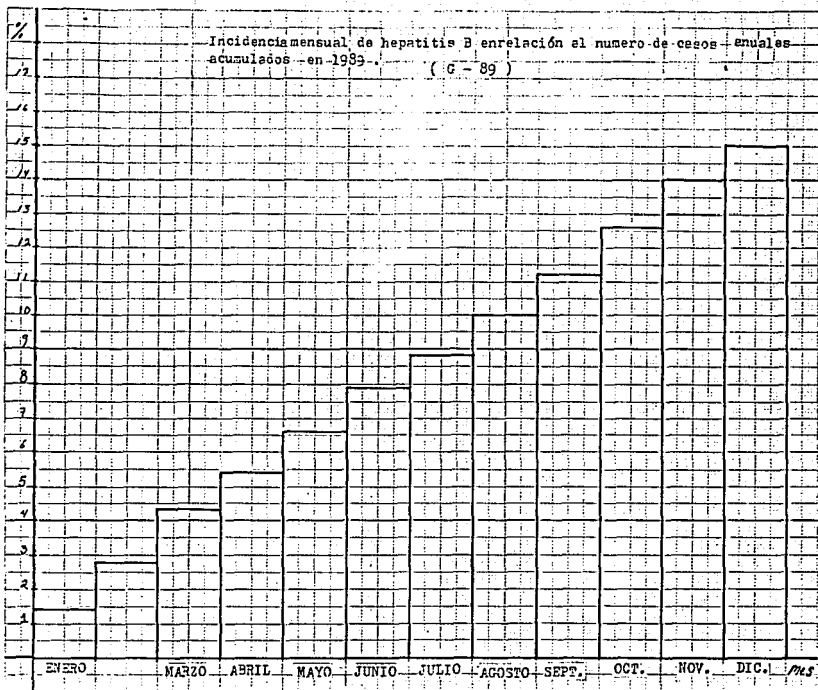
ESTADO	No de casos	% por EDO.	No de casos	% por EDO.
AGUASCALIENTES	546	0.4 %	593	1.0 %
B.C. NORTE	3019	2.2 %	1744	3.0 %
B.C. SUR	1434	1.5 %	843	1.5 %
CAMPECHE	365	0.3 %	180	0.3 %
COAHUILA	3043	2.2 %	1420	2.5 %
COLIMA	1323	1.0 %	638	1.2 %
CHIAPAS	3665	2.7 %	1409	2.5 %
CHIHUAHUA	7249	5.3 %	1404	2.4 %
DISTRITO FEDERAL	28521	21.0 %	12372	21.6 %
DURANGO	1834	1.4 %	999	1.7 %
GUANAJUATO	2706	2.0 %	951	1.6 %
GUERRERO	1610	1.2 %	862	1.5 %
HIDALGO	6066	4.5 %	1430	2.6 %
JALISCO	7599	5.6 %	3104	5.4 %
MEXICO	13058	9.6 %	5922	10.3 %
MICHOCAN	4895	3.6 %	1374	2.4 %
MORÉLOS	1112	0.8 %	547	1.0 %
NAYARIT	1052	0.8 %	715	1.3 %
NUÉVO LEÓN	6700	4.9 %	3190	5.6 %
OAXACA	2015	1.5 %	740	1.7 %
PUEBLA	3650	2.7 %	1632	3.0 %
QUERÉTARO	1119	0.8 %	811	1.4 %
QUINTANA ROO	1084	0.7 %	507	0.9 %
SAN LUIS POTOSÍ	3103	2.3 %	1493	2.6 %
SINALOA	1433	1.0 %	731	1.3 %
SONORA	2010	1.5 %	1294	2.3 %
TABASCO	1459	1.0 %	647	1.1 %
TAMAULIPAS	7360	5.4 %	2202	3.8 %
TLAXCALA	547	0.4 %	357	0.6 %
VERACRUZ	13619	10.0 %	5308	9.3 %
YUCATÁN	1667	1.2 %	635	1.1 %
ZACATECAS	973	0.7 %	316	0.5 %

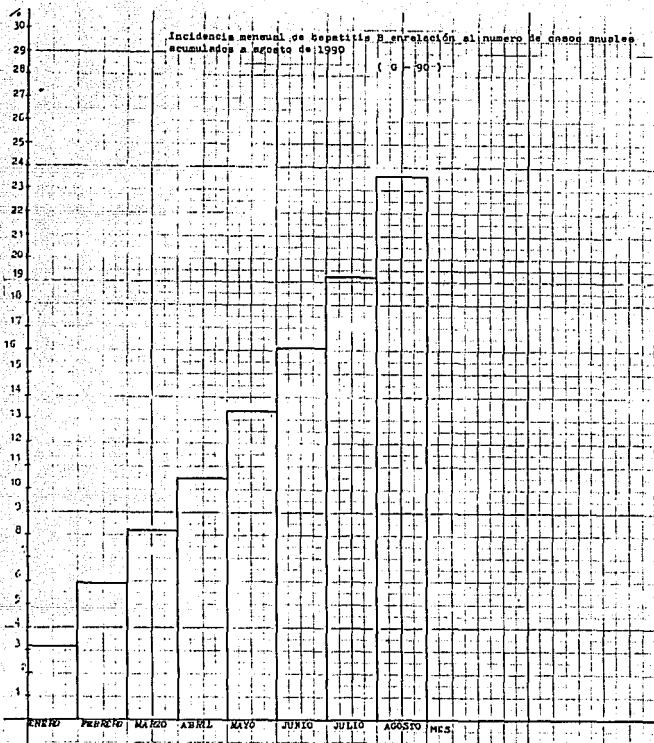
TABLA 5-4

(Porcentaje por mes durante los años 1989-1990)

	=AÑO 1989=		=AÑO 1990=	
	No de casos	% por mes	No de casos	% por mes
ENERO	1904	1.4 %	1815	3.2 %
FEBRERO	3792	2.8 %	3368	5.9 %
MARZO	5881	4.3 %	4734	8.3 %
ABRIL	7316	5.4 %	5996	10.5 %
MAYO	8965	6.6 %	7657	13.4 %
JUNIO	10609	7.9 %	9255	16.1 %
JULIO	11909	8.8 %	10987	19.2 %
AGOSTO	13610	10.0 %	13546	23.6 %
SEPT .	15226	11.2 %		
OCTUBRE	17048	12.6 %		
NOV .	19140	14.0 %		
DIC .	20356	15.0 %		

Nota: el porcentaje se ha calculado apartir del número total de casos reportados durante todo el año.





C O N C L U S I O N E S

La hepatitis B es una infección que compromete directamente la función del hepatocito en el hígado, y que puede originar un problema cirrótico que potencialmente termina en un hepatocarcinoma.

El problema social que representa parece estar aumentando como resultado del uso cada vez mayor de productos sanguíneos para nuevos tratamientos médicos, aunado al incremento de reservorios de portadores crónicos y al uso de drogas intravenosas.

La incubación en las células de hígado de mono permitió conocer el mecanismo de infección del virus de hepatitis B (hipótesis de la infección latente), su transporte al hígado por medio de un receptor para la albúmina polimerizada, la que transporta al virus por vía sanguínea a su destino; el virus está constituido de una doble trenza de DNA circular, además de poseer una DNA polimerasa que actúa como retrotranscritasa, lo que facilitó su clasificación en el grupo llamado hepadnavirus.

El genoma viral está constituido por cuatro genes "S,C,P,X" cada uno de ellos codifica para estructuras bien definidas, gracias a que se conocen todos los marcadores antigénicos del virus de hepatitis B, se ha podido detectar por medio de la técnicas de identificación "EIA", de gran sensibilidad y técnicas de hibridación de DNA.

La vacuna gen havac B llamada vacuna de tercera generación, la que es obtenida por recombinación genética sobre células CHO que proveen una mayor cantidad de antígeno Pre S-2 y por consiguiente la respuesta anti-Pre S2, son superiores a las anteriormente obtenidas a través de las vacunas de segunda generación.

La incidencia de hepatitis B en nuestro país durante los años de 1989-1990 demuestran que el mes con mayor número de casos reportados en 1989 fué el mes de diciembre, en 1990 el mes de agosto, la entidad federativa con mayor número de casos reportados en 1989 y 1990 fué el Distrito Federal, el segundo y --tercer lugar lo ocupan los estados de Veracruz y México, esto se presenta por que el índice de casos esta en relación con el ritmo de crecimiento de la población mexicana, en estas entidades federativas es donde se registra el mayor crecimiento de población, todas aquellas entidades federativas cuyo índice de casos es muy bajo es por que el índice de crecimiento poblacional también es muy lento; al conocer estos antecedentes, el problema sanitario toma un camino alarmante ya que --tres cuartas partes de la República Mexicana, pueden presentar el mayor número de casos de hepatitis B dentro de algunos años, según nuestro crecimiento poblacional, aunado a esto, se

encuentra la desinformación sobre como tratar la hepatitis, por que si bien es sabido que no es el único agente etiológico que puede causarla, el tratamiento médico es el mismo, esto favorece el número de personas potencialmente infectantes que pueden desarrollar un proceso carcinogenico ó ser portadores crónicos.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Beasley, R.P. (1984)
In viral hepatitis and liver disease. J. Med. Clin. 6:26
- 2.- Eddleston, A.J y Weber, C.P.
Immunoreactions in liver. Ed. Pitman Medical, U.S.A 1981
- 3.- Rizzetto, C.M. (1977)
Immunofluorescence detection of new antigen-antibody:
system (delta-anti-delta) associated to hepatitis B virus
in livers and in serum of HBs-Ag. J. Med. 18:977
- 4.- Amoroso, P.A (1986)
Delta infecci3n in the naples. Epidem. Clin. 1:267
- 5.- Leuttan, L.A y Carthy, J.C. (1987)
Outbreak of severe hepatitis due to delta and hepatitis
B viruses. N. eng. J. Med. 12:1256
- 6.- Dubois, F. G. y Rolingeard, A.P. (1988)
Diagnostic serologique et epidemiologique des hepatitis
B delta indre. Biol. Clin. Gastro. 12:88
- 7.- Paul, J. R. y Havens, Q.P. (1945)
Transmission infections the hepatitis B. Biol. J. Med 1:123
- 8.- Visnich, S.A y Alter, H.J. (1965)
New antigen in leukemia sera. J. Med 191:541
- 9.- Maynard, J.E. y Bradly, D.W. (1985)
Preliminary etudies of hepatitis B in chimpanzees. J. Infect.
131:194
- 10.- Southerm, E.M. (1975)
The DNA diagnostic of hepatitis B viruses in liver.
J. Mol. Biol. 98:503
- 11.- Goudeau, C.Q (1982)
Transmission mere enfat du virus de l'hépatite B, perspecti
ves et prévention de l'infection neonate.
Pres. Med. 11:3051
- 12.- Summers-Kill, J (1974)
Prednisona for chronicle liver disease titration, and com-
bination with azathioprima. Cell. Gut 16:305
- 13.- Summers-Kill, J. (1982)
Identification in liver cell the virulent antigen of middle
on hybridization-transfer. Cell. 29:403

- 14.- Purcell, R.H. (1985)
Understanding of hepatitis B virus morphology. Viro. 9:49
- 15.- Roudeau-thoraval, I. (1989)
Prévalence du portage de l' AgHBs et, des marqueurs de -
replication virale dans, une population de fermes B en
ceints en france. Gastro. Clin. Biol. 13:353
- 16.- Galibert, A Hall (1987)
Hepatitis B filaments S. Lancet. 1:8377:607
- 17.- Sicot, C.I. (1990)
Hepatitis B rappel sur la structure du virus B et, sur l'an-
tigen e Pre S2. Coll. Ins. 194:355
- 18.- Heerman, K.H. (1984)
of what to use protein associated to hepatitis B virus. -
J. of Virol. 52:396
- 19.- Sttibe W.H. (1983)
Short patrimony of hepatitis B virus. J. of Virol. 46:626
- 20.- Pizzarro, S.E.
Organization of virus, ed. Washington D.C., U.S.A 1971
- 21.- Chackraborty, P.R. (1986)
Hepatitis B protein composition of antigens virus derived
enveloped. J. Virol. 58:945
- 22.- Edmany, J. (1980)
Fulminant viral hepatitis. Nature 286:536
- 23.- Tiollis-Pierre, Y.D.
El virus de la hepatitis B. Ed. Manual científico, Méx. 1987
- 24.- Sicot, C.I. (1896)
Marqueurs seriques du virus B avant le. Conc. Med.
108:12:967
- 25.- Bouvier le, G.L. (1975)
Serotypes of hepatitis B antigens (HBsAg) the problem of
new determinant an exemplified "b" y "t". Sci. J. Med.
2:270
- 26.- Stephen-Feinstone, M.
Antigens virus B derived enveloped heart, Ed. Amer. Public.
Assoc. Inc. N.W., U.S.A. 1986
- 27.- Argona, M. (1986)
Serological response to the hepatitis delta virus in hepa-
titis D. Lancet. 1:1478

- 28.- Diacton, L.J.
Virus cycles from duplicate hepatitis B, Ed. Interamericana, Méx. 1986
- 29.- Chackrabort, E.S. (1980)
The cycles from to argue against virus from hepatitis B. Nature, 286:535
- 30.- Herman, N.K. (1987)
Large surface proteins of hepatitis B virus containing -- the Pre S sequence. J.of Virol. 52:396
- 31.- Elfassis, W.A.
Deteccion of hepatitis B virus and product using an poen reading frame Escheria coli: expression vector proceedings. Academy. of Scienc. national. 83:2219
- 32.- Nourah, A.R. (198)
Antibodies recognizing human serum albumin are not elicied by immunization with Pre S2 sequences of the hepatitis B virus enveloped protein. J.Med. Virol. 24:137
- 33.- Michel, M.L. (1988)
Synthesis of hepatitis B surface antigen particles containg the Pre S region expression; product in hepatocellular carcinoma. Mol. Biol. 1:13
- 34.- Rutter, W.J. (1981)
Viral hepatitis and liver antibodies to a syntheceptide from the Pre S and region gentique. Science. 213:406
- 35.- Lemonne, R.J. (1983)
Hepatitis B virus infection in cultured human lymphoblastoid Cells. Science. 221:667
- 36.- Borquis, K.R. (1972)
Experimental infection of chimpanzees with the virus of - Hepatitis B. Nature. 273:514
- 37.- Peters, R.L. (1975)
Viral hepatitis B a pathologic spectrum. Am. J. Med. Sci. 270:17
- 38.- Goudeau, A. (1990)
Hepatitis B. In. Laborama Inst. Pasteur. 4:1
- 39.- Dudley, f.j. (1972)
Immunity cellular and hypothesis associated virus B, Lancet 1:725

- 40.- Hirsman, S.Z. (1975)
Integrator enzyme hypothesis for replication of hepatitis B-virus. Lancet 2:46
- 41.- Krugman, S.Y. y Cocke, D.J.
Hepatitis viral B. Ed. Interamericana, Méx. 1989
- 42.- Gorin, J.L. (1988)
Biochemical characterization of surface antigen evidence for detective particles of hepatitis B virus. J. of Med. Pathology. 81:651
- 43.- Kaplan, P.M. (1986)
Demonstration of subpopulation of dane particles. J. of Virol. 17:885
- 44.- Robinson, W.S. (1987)
The genome of hepatitis B virus. Rev. Microb. 31:357
- 45.- Dudley, F.J. (1982)
Cellular immunity and hepatitis associated antigen in liver disease. Lancet. 1:723
- 46.- Cocke, D.J. (1985)
Extrahepatic manifestations of viral hepatitis. J. Med. Scien. 1:270
- 47.- Rodes, J.M.
Manual de las enfermedades del hígado y vías biliares. Ed. Médico científica, Méx. 1986
- 48.- Vittu, B. (1990)
Hepátite et grouseese comment interpréter les; le hipotete cellule hepátite. Méd. Jan. 161:55
- 49.- Zuckerman, A.J.
Hepatitis viral B. Ed. I.M. Arias Med. Excrepta, Méx. 1981
- 50.- Degos, F.T. (1988)
Le hipotete de virus I'hepátite B. Med. et. Sienc. -- 4:629
- 51.- Hayaashi, J. (1987)
Hepatitis B virus transmission in nursery. J. of Epidem. 125:492.

- 52.- Andreanit, K.N. (1987)
Prevention de l'hepatite B parle vaccin. J. of Virol.
35:14:762
- 53.- London, W.S. (1988)
Antigen (HBs) the surface and acute viral hepatitis B.
Ann. Intern. Med. 70:55
- 54.- Mourier, D. (1985)
Portage de l'AgHBs chezles fermes enceintes nursers du
virus. Presse. medicale. 29:14
- 55.- Gay, D.L. (1989)
Horizontal transmission of hepatitis B virus. Lancet.
22:889
- 56.- Karvountzin, G.D. (1974)
Studies of patients surviving fulminan viral hepatitis.
Gastroenterology. 67:870
- 57.- Holmes, A.W. (1989)
Hepatitis A in marmosets induction of disease with --
cospecimens from a human voluhtee study. Science. --
165:816
- 58.- Wright, R. (1989)
L'hepatite B lotte centre une pandemie. In. Laborama -
1:1
- 59.- Denisf, M.B. (1985)
Portage de l'AgHBs chezles fermes et. diffusion du vi
rus dans leur. Presse. Medicale. 14:29:1564
- 60.- Berman, H. (1991)
The chronic sequelac of non A, non B hepatitis. Ann. Irto.
Med. 1:2
- 61.- Tabor, E.M. (1987)
Deteccion of an antigen-antibody system in serum asso
ciated whit non A non B hepatitis. J. Med. Virol. 1:161
- 62.- Shirach, R.S. (1989)
Hepatitis antigen in non A non B postransfusion hypothe
sis from transmission. Lancet. 2:853
- 63.- Tabor, M.K. (1989)
Antigen-Antibody system associated whit non A non B
hepatitis detected by indirec immunofluorescence. Lancet.
2:221

- 64.- Rizzeto, M. (1977)
Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta-ant-delta) associated to hepatitis B. In. Laborama. Inst. Pasteur. 8:977
- 65.- Wang, K.S. (1986)
Structure sequence and expression of the hepatitis - delta viral genome. Nature. 323:508
- 66.- Weiner, A.J. (1988)
Single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope of both hepatitis delta antigen polypeptides P 24 and P27. J.of Virol. 1:594
- 67.- Bonino, F. H. (1986)
Hepatitis delta virus protein composition of delta - antigen and its hepatitis B virus derived enveloped. J.of Viol. 58:945
- 68.- Gouindarajan, S.C. (1984)
Fulminant B viral hepatitis role of delta agent. Gastroenterology. 86:1417
- 69.- Macayno, S.A. (1987)
Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D. Lancet. 1:478
- 70.- Marcellin, P.J. (1988)
Hepatitis due to hepatitis delta virus. Comm. Meet. Belgium. 1:8
- 71.- Fico, P.R. (1989)
Delta infection in the naples area epidemiologic and clinical significance. J.of Hepatol. 2:11
- 72.- Dimitrakakis, M.G. (1986)
Prevalence of delta infection in the western pacific region. J. Med. Virol. 18:335
- 73.- Dubois, S.Z. (1988)
Hepatitis delta virus (HDV) infection in french male HBs Ag positive homosexuals. J. Hepatol. Scien. 60:814

- 74.- Baco, G.F. (1988)
Diagnostic serologique et epidemiologique des hépatites
aigües delta en indre-et-loire. Gastroente.Clin.Biol
12:887
- 75.- Blumberg, B.S. (1985)
New antigen in leukemia sera. J. Med. Ass. 191:541
- 76.- Lennette, E
Diagnostic procedures for viral. Ed. N.W. Healt Ass.,--
U.S.A. 1979
- 77.- Prince, A.M. (1989)
Antigen detectd in the blood during the incubation
period of serum hepatitis. Nature.Academic Sci 60:814
- 78.- Alter, H.J. (1986)
Contraelectrophoresis for detection of hepatitis antigen.
J.Clin.Med. 77:1000
- 79.- Pesedorfer, F. (1988)
Contraelectrophoresis chernach weis hepatitis B Klin.
Clin.Med. 48:58
- 80.- Leach, J. M. (1981)
Detection of hepatitis associated antigen by the latex
agglutination. J.Med. 4:597
- 81.- Roit, I.M.
Immunology. Ed.ST. Louis D.C. N.Y., U.S.A. 1979
- 82.- Shulman, N.R. (1980)
Hemagglutination assay for antigen and antibody associat
with viral hepatitis. Science. 170:332
- 83.- Mayumi, M. (1981)
Deteccion of australia antigen by means of immune adheren
ce hemagglutination. Sci.Sang. 20:178
- 84.- Gold, J.W. (1987)
Hemagglutination assay for antibody to sudtypes of hepati
tis B antigen. J.Immunology. 122:1100
- 85.- Szmunesaw, S.H. (1982)
Hepatitis and blod transfusion in hepatitis B immune glo-
bulin. Nature. 335:347
- 86.- Shulman, N.R. (1989)
Virus like antigen antibody complex in hepatitis measu by
complement fixation. Science. 165:304

- 87.- Purcell, R.H. (1988)
Preparation and characterization of complement fixing
Hepatitis-associated antigen and antiserum. J. Infect.
121:222
- 88.- Walsh, J.H. (1989)
Complement fixation tes for measuring australian antigen
and antibody. J. Infect. 120:383
- 89.- White, O. D.
Virology medical. Ed. Acad. Press. N.Y., U.S.A. 1987
- 90.- Stewart, S.
Inmunología. Ed. Harla, Méx. 1981
- 91.- Bayer, M.A. (1988)
Particles associated with australian antigen. Nature.
218:1057
- 92.- Ling, C.M. (1982)
Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by
direct radio immuno assay whit I 125 antibody. J. Inmu-
nology 109:834
- 93.- Alter, H.D. (1973)
Microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis B
antigen. Microbiol. Appl. 26:478
- 94.- Lander, J.J. (1971)
Frecuence of antibody to hepatitis- associated antigen
as measured by a new radioimmunoassay technique. J. In-
munology. 106:1166
- 95.- Chaul, C. (1984)
Hepatitis B techniques the detection by hybridation J.
of Viroi. 51:776
- 96.- Sothern, J.E. (1985)
Techniques the detection by hybridation of the hepatitis
B. Biol. Mol. 5:3
- 97.- Brechot, P.R. (1980)
Detección del DNA del HBV por la técnica de transferen-
cia hibridación. Mundo Científico. 26:6:33
- 98.- Margani
Inmunología é immunoquímica. Ed. Médica panamericana, -
Méx. 1990

- 99.- Engvall, E. (1982)
Enzyme-linked immunoadsorbent assay ELISA. quantitation of specific antibody by enzymes-labeled anti-immunoglobulin in antigen. J. Immunology. 109:129
- 100.- Wolters, G.K. (1986)
Phase solid ELISA. for detection of HBV surface antigen. J. Clin. Phatol. 29:873
- 101.- Kaplan, L.R.
Métodos de análisis. Ed. Médica panamericana, Méx. 1990
- 102.- Golub, S.E.
Immunology and synthesis. Ed. Sonderland Massachusetts, U.S.A. 1990.
- 103.- Diagnostic, Pasteur
Microbiology immunology. Ed. Maury-Imprimer S.A., - Fran. 1991
- 104.- Gady, G.F. (1985)
Hepatitis B immunoglobulin prevention of hepatitis - from accidental exposure among medicinal personale. New. Eng. Med. 292:1067
- 105.- Gady, G.F. (1986)
Hepatitis prevention. J. Med. 29:1070
- 106.- Varma, R.R.
Hepatitis B surface antigen carrier state inneonatus profilaxis with large doses of conventional immune - human serum globulin. J. Med. Scien. 236:2304
- 107.- Maupas, P. (1977)
Hepatitis B virus and primary liver carcinoma evidences for a filiation of hepatitis B cirrhosis and -- primary liver cancer. Ann. Microbiol. Paris. 128:245
- 108.- Maupas, P. (1976)
Immunization against hepatitis B in man. Lacet. -- 1:1367
- 109.- Alter, H.J. y Barker, L.F. (1980)
Hepatitis B immunoglobulin evaluation of clinical. - New. Eng. Med. 293:1093
- 110.- Hilleman, H.R y Baynak, E. B. (1985)
Purified and inactivated human hepatitis vaccine progress report. J. Med. Scien. 270:401

- 111.- Maupas, P. (1981)
Efficacy of hepatitis vaccine in prevention of early HBs-Ag carrier state in children. Lancet. 1:279
- 112.- Neurath, A.R. (1986)
Antigenic sites related to human serum proteins revealed by affinity chromatography: Hepatitis B antigen. Acad. Science. 71:2663
- 113.- Couroucé, A.M. (1986)
Prevent hepatitis by using specific anti-HBV antigen in haemodialysis patients. Lancet. 2:377
- 114.- Neurath, R. (1986)
Hepatitis B virus enveloped are virus neutralize vaccine with children in Senegal. J. Immunol. in Press. 4:35
- 115.- Hilleman, H.R. (1982)
report form vaccine human hepatitis B. Nature. 298:347
- 116.- Szemunes, H.W.
Viral hepatitis B international simposium. Ed. Franklin Inst. Press., U.S.A. 1981
- 117.- Maupas, P.
Gen hevac B Pasteur Vaccine recombinant contre l'hepatite B. Ed. Gabrielle Inst. Past., Franc. 1991
- 118.- Strick, N. (1986)
Antibodies to a synthetic peptide from the pre S2-145 region of the hepatitis B virus enveloped are virus neutralizant vaccine. Immunology. 4:37
- 119.- Symposium (1987)
Immunogenicity and safety of new recombinant hepatitis B. Abstracts. 1:105 A
- 120.- Tron, F.R. (1988)
Le génie génétique vaccins obtenus par génie génétique la revue du praticien. Inst. Past. Vaccins. 38:45
- 121.- Adamowicz, Ph. (1988)
Hepatitis B vaccine containing the S and pre S2 antigen procedure in chinese hamster ovary cell. Alanr. Liss, Inc. 1:1087

- 122.- Tron, F.R. y Marzert, M.C. (1987)
 Caracteristiques immunogénicité et tolerance d'HBs Ag
 synthetisées dans des cellules de mammiferes. Sem.---
Int. sur le vaccinations en Afrique. 30:295
- 123.- Yukio, I.E. (1989)
 Synthetic peptide vaccine involving the product of
 the Pre S2 region of hepatitis B virus DNA protective
 efficacy in chimpanzees. Med. Scien. 83:9174
- 124.- Zanetti, A. (1984)
 Dissociated antibody responses to the sand pre S re-
 gions of the hepatitis B virus. J. of Med. Virol. ---
 28:156
- 125.- Coursaget, P.B. (1988)
 Immunogenicidad d'un vaccin conte l'hépatite B obtenu
 por recombinaison génétique et. al contenant le pro--
 duits des gènes S et Pre S2. Presse Médicale. 17:22: -
 1150
- 126.- Congres Pasteur Vaccins-Istanbul
 Developpement por gené génétique d'un vaccin contre l'
 hepatite B Ed. Alan Liss. Inst. Past., France. 1988
- 127.- Tiollais, P. (1988)
 Unite de recombinaison et expression genetique viral
 hepatitis B and liver. Inst. Past. Paris. 14:32:298
- 128.- Brechot, C. (1988)
 Rappel sur la structure du virus B et. sur l'antigène
 Pre S2 diagnostic et. prevention des infection parle
 virus de l'hepatite B un exemple d'application des -
 recombinaisons génétiques la revue du protieien. Nouv.
Eng. Médecine. 306:384
- 129.- Philippe, A. (1989)
 Randomiced dose range study of a recombinant hepatitis
 B vaccine produced in mammalian cell and containig --
 the S and pre S2 sequences. J. of. Infections. 160:199
- 130.- Stephem, B. H. (1985)
 Hepatitis B virus contains Pre S2 gene-encoded dominan
 ta. Nature. 95:154
- 131.- Pontissou, E.S. (1989)
 Synthesis in CHO cells of hepatitis B surface antigen.
Inst. Virol. 136:195

- 132.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1989, 4:7:108
- 133.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1989, 4:8:120
- 134.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1989, 4:9:132
- 135.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1989, 4:10:148
- 136.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1989, 4:11:168
- 137.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1989, 4:12:179
- 138.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:2
- 139.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:3
- 140.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990,5:4

- 141.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:5
- 142.- Sector salud, S.S.A.
Sistema Nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990,5:6
- 143.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:7
- 144.- Pasteur, Vaccins. (1989)
L'hepatite B les risques d'entre infecté par le virus. Epidem. Inst. Past. 1:11
- 145.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:9
- 146.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:10
- 147.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:11
- 148.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedad. Boletín Mensual. Epidem. 1990, 5:12
- 149.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1991, 6:1
- 150.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem. 1991,6:2

- 151.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem.
1991,6:3
- 152.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem.
1991,6:4

- 151.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem.
1991,6:3
- 152.- Sector salud, S.S.A.
Sistema nacional de salud: Informe mensual de casos nuevos de enfermedades. Boletín Mensual. Epidem.
1991,6:4