



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

DETECCION DEL ANTIGENO SOLUBLE DE LA  
HEPATITIS TIPO "B", POR DIFERENTES  
METODOS.

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

p r e s e n t a :

MARIA TERESA GARCIA FIGUEROA



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

LAG TESIS 1978  
ABO M.T. 18 / 1871 178  
FECHA \_\_\_\_\_  
PRGC \_\_\_\_\_  
S \_\_\_\_\_



JURADO ASIGNADO:

Presidente            Q.F.B. OSCAR AMOR DODERO.  
Vocal                Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.  
Secretario          Q.F.B. SALVADOR MARTIN SOSA.  
1er. Suplente      Q.F.B. ERNESTINA BALLESTEROS RUEDA.  
2do. Suplente      Q.F.B. SOCORRO CAO ROMERO MARTINEZ.

Sitio donde se desarrolló el tema:  
LABORATORIO DE VIROLOGIA DEL HOSPITAL DEL NIÑO  
DIF (antes IMAN).

Sustentante:                    MARIA TERESA GARCIA FIGUEROA.

Asesor del tema:                Dr. SALVADOR MARTIN SOSA.

Mi más sincero agradecimiento  
y respeto a todas las personas  
que hicieron posible la reali-  
zación de este trabajo:

Al H. Jurado:

Q.F.B. OSCAR AMOR DODERO.

Q.F.B. MAGDALENA ACOSTA SEGURA.

Q.F.B. SALVADOR MARTIN SOSA.

Q.F.B. ERNESTINA BALLESTEROS R.

Q.F.B. SOCORRO CAO ROMERO M.

Mi más sincero agradecimiento y respeto al Dr. Salvador Mar  
tín Sosa sin cuya valiosa ayu  
da no hubiera sido posible la  
realización de esta tesis.

Con sincero agradecimiento y  
respeto a todos los profesore  
s que me han ayudado en --  
mis estudios.

Agradezco al Hospital del Niño D.I.F. (antes I.M.A.N.) las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Mi sincero agradecimiento a todo el personal del D.I.F. que me brindó apoyo y ayuda, en especial a los departamentos de Virología y Medicina Nuclear.

Con mucho cariño a quienes me han  
dado todo, mis padres: Ranulfo y  
Rafaela.

Gracias a su ayuda y consejos he po  
dido realizarme como profesionista.

Con cariño y respeto a mis  
hermanos:

Ma. Magdalena

Rafael

Ma. Elena

Vicente

José Luis

Por su comprensión y ayuda.

Con todo cariño para mi esposo  
Q.F.B. Mauro Arrieta S.

Por ser tan bueno y comprensivo,  
gracias por el apoyo y estímulo  
que siempre me has brindado.

Con todo mi amor a mi pequeña  
hija Teresa Elizabeth; espero  
que algún día sientas la satis  
facción de haberte realizado.

Con todo cariño y respeto  
a mis familiares y amigos.

Con mucho cariño a mis ahijados:  
Luz María, Chayito y Rafa.

I N D I C E.

Pág.

## CAPITULO:

I.- INTRODUCCION.....	1
II.- ANTECEDENTES HISTORICOS.	
Antígeno Australia, nomenclatura ac- tual y subtipos. ....	4
III.- HEPATITIS VIRALES.	
Generalidades y diferencias. ....	11
IV.- HEPATITIS VIRAL TIPO "B".	
Clasificación de acuerdo a su cuadro clínico. ....	16
Aspectos inmunológicos. ....	22
Etiología. ....	23
Epidemiología. ....	24
Patología. ....	26
Tratamiento. ....	28
Prevención y control. ....	29
V.- AGENTE CAUSAL.	
Características del "AgsHB". ....	31
Efecto de agentes Físico-químicos. ...	38
Intentos para replicarlo. ....	40
Importancia Bio-médica. ....	43

	Pág.
Posibles efectos teratogénicos. ....	44
VI.- METODOLOGIA PARA LA DETECCION DEL - - AgsHB"	
Clasificación y generalidades. ....	46
VII.- MATERIAL Y METODO.	
Material Biológico. ....	53
Micrométodo de Ouchterlony. ....	55
Método de contra inmuno electrofore-- sis. ....	61
Método de hemaglutinación reversa pa- siva. ....	70
Método de fijación de complemento. ....	82
Método de radioinmunoanálisis. ....	87
VIII.- RESULTADOS Y DISCUSION. ....	94
IX.- CONCLUSIONES. ....	103
X.- BIBLIOGRAFIA. ....	105

## CAPITULO I.

INTRODUCCION:

La hepatitis viral continúa siendo un problema de salud pública, de distribución mundial, debido a la gran dificultad para aislar y propagar los virus causantes de la enfermedad.

Existen varios reportes, como veremos en el transcurso de este trabajo, sobre intentos que se han hecho para aislar los virus tanto de la hepatitis tipo "A" como de la tipo "B", en cultivos de tejido, pero ninguno ha sido realmente satisfactorio. La propagación de estos virus en modelos animales experimentales también ha presentado grandes dificultades, lo cual ha contribuído así mismo a frenar el avance de las investigaciones sobre estos dos agentes patógenos.

En el momento actual y desde un punto de vista eminentemente práctico, el único recurso útil para reconocer la presencia de uno de estos virus, el tipo "B" es la detección del antígeno descubierto por Blumberg en 1964 (7) llamado antígeno Australia por este investigador por haber sido identificado originalmente en el suero de un aborigen australiano. A pesar de que este antígeno, cuya relación con el virus de hepatitis "B" está plenamente demostrada, sólo es detectado en aproximadamente el 50 % de los individuos portadores, sanos o enfermos, es posible reducir de manera significativa la posibilidad de transmitir el agente patógeno si se aplican métodos satisfactorios para su detección.

Quizá la reducción más importante de casos de hepatitis ha sido lograda en el caso de las llamadas hepatitis pos-transfusionales, que en el pasado constituía una proporción importante de casos de hepatitis viral, del orden de 1% del total de transfusiones y con una mortalidad del 0.1% también del total de los individuos transfundidos. Si tomamos en consideración que el hombre puede convertirse en portador sano con antigenemia persistente tal vez por tiempo indefinido, el riesgo de transmisión del virus tipo "B" a partir de portadores sanos es considerablemente más elevado que cuando se trata de enfermos en los que la enfermedad ha sido diagnosticada y se han tomado las medidas precaución indicadas. Por otra parte se sabe ahora que la transmisión del virus tipo "B" puede realizarse por mecanismos muy diversos, generalmente en todas aquellas condiciones en las que existe solución de continuidad entre un tejido sano y sangre o fluidos orgánicos contaminados; se sabe también que este antígeno puede ser detectado en saliva, orina, semen, heces, fluido menstrual, de ahí que las probabilidades de transmisión sean mayores de las que se pensaba hasta hace algunos años, y a ello debemos agregar la posibilidad de transmisión por la vía oral plenamente comprobada así mismo.

La importancia del problema está ampliamente fundamentada en la literatura biomédica de los últimos 10 años principalmente, y resultaría demasiado extenso tratar de presentar en esta introducción todas las situaciones que han permitido llegar a establecerla; sin embargo es necesario hacer

énfasis en que, por ahora, el único recurso de laboratorio que nos permite definir el diagnóstico - de hepatitis por virus "B" es la detección del - - "Ag<sub>s</sub>HB", por lo cual resulta particularmente impor tante también el manejo adecuado de la metodología disponible en el momento actual.

La diversidad de técnicas desarrolladas para este fin ha hecho indispensable para muchos laboratorios tratar de seleccionar el o los métodos que - en mayor grado pudieran resultar adecuados en sus - condiciones de trabajo. Como se verá, a lo largo - de este estudio ha sido posible reconocer ventajas y desventajas de los métodos analizados críticamen te con el propósito de ofrecer a otros laborato - rios y bancos de sangre alternativas asequibles; - puesto que con gran frecuencia lo "ideal" se aleja bastante de lo "real", esto es, de lo realizable - en la práctica.

## CAPITULO III.

## ANTECEDENTES HISTORICOS

ANTIGENO AUSTRALIA, NOMENCLATURA ACTUAL Y SUBTIPOS.

La hepatitis es una enfermedad infecto-contagiosa sistémica, pero que ataca principalmente el hígado, y se conoce desde hace más de 2 000 años.- En tiempo de Hipócrates (377 A.C.) ya era conocida; posteriormente, Galileo y Celsius hicieron una descripción relativamente buena de la enfermedad. Actualmente la hepatitis viral es una de las enfermedades más peculiares, que presenta el riesgo de -- una contaminación accidental, ya que todavía no se cuenta con una vacuna efectiva y ni si quiera se ha podido aislar el agente causal en cultivo de tejidos ni en animales de laboratorio.

Aunque se piensa que siempre han existido -- las formas epidémica y endémica, su origen viral y su patogenia sólo han sido reconocidos recientemente.

En un principio se consideraba que una hepatitis no tóxica era de origen infeccioso, y así se denominó "Hepatitis Infecciosa", y se pensaba que era el resultado de una contaminación fecal de alimentos y agua. Por lo tanto se le consideraba como enfermedad endémica en niños, y ocasionalmente llegaba a ocurrir en adultos, sobre todo en tiempo de guerra cuando se presentaban con más frecuencia -- epidemias de hepatitis. La epidemiología de la enfermedad llegó a conocerse bastante bien, conside-

rándose que solo era transmitida por la vía digestiva, además se conocía el período de incubación de la enfermedad.

Durante la 2a. guerra mundial (1938-1943) se reconoció un tipo diferente de hepatitis, que se presentó en muchos soldados de los EUA. que habían recibido una vacuna contra la fiebre amarilla, preparada con plasma humano. En ese entonces se reportaron 26,771 casos de hepatitis, aunque se estima que el número fue mayor, y la tasa de mortalidad de casos reconocidos fue de 3 por 1 000 (1). Se consideró diferente porque en esta ocasión el período de incubación fue más largo que el reportado en casos de hepatitis infecciosa. Además, el origen etiológico no era el mismo, ya que en esta ocasión se trataba de plasma humano, posiblemente icterico.

Entonces se enfocó la atención sobre este agente que producía una enfermedad similar a la hepatitis infecciosa, a la que llamaron hepatitis por suero, ya que éste era la fuente de transmisión, y empezó a reconocerse como una importante entidad etiológica.

Tomando en cuenta esta nueva variedad de hepatitis, en estudios retrospectivos se encontró que en 1883 (2) ya se había presentado un brote epidémico de hepatitis por suero, que siguió a la inyección de vacuna anti-variolosa (smallpox) preparada con suero humano y que había sido clasificada como una epidemia de ictericia. Por 1930 Stokes y colaboradores (3) reconocieron una "ictericia" diferente que seguía al tratamiento parenteral con

arsénico, para tratar la sífilis, la cual era más bien de tipo infeccioso que de tipo tóxico. En 1938, Propert (4) reportó casos de mortalidad por el uso de suero humano de convaleciente de sarampión, confirmando el hallazgo de Mac Nulty (5) realizado un poco antes, después se relacionaron estas epidemias de "ictericia por jeringa", con hepatitis séricas.

Hasta ahora los agentes de la hepatitis infecciosa y de la hepatitis sérica no han podido ser cultivados "in vitro", ni plenamente identificados; no obstante, se piensa que cuando menos son dos los tipos de virus causantes, y en 1951 Mac Callum y sus colaboradores (6) sugirieron los nombres de hepatitis tipo "A" y de hepatitis tipo "B" respectivamente, y si se presentara otra variedad se le podría denominar C, D, etc.

La hepatitis de período corto de incubación fue llamada tipo "A", o sea llamada hepatitis infecciosa, ya que se pensaba que sólo era producida por contaminación de alimentos y agua con heces y orina infectadas. También se le denominaba hepatitis epidémica, ictericia catarral aguda, y en Rusia se le llamó enfermedad de Botkin.

A la hepatitis viral que Mac Callum denominó tipo "B" se le ha conocido también como hepatitis de larga incubación, y como se pensaba que sólo era transmitida por vía parenteral se le denominó así mismo hepatitis por suero, postransfusional, ictericia por suero homólogo, ictericia por jeringa, etc.

Las dificultades encontradas por todos los investigadores para aislar los agentes etiológicos de estas hepatitis de origen infeccioso dieron por resultado un decaimiento en el interés sobre su estudio.

Con ayuda del microscopio electrónico se definió que muy probablemente eran virus los causantes ya que se habían observado partículas con estructura viral en el suero de muchos pacientes con hepatitis aguda. Casi todos esos estudios resultaron poco concluyentes principalmente por la imposibilidad de replicar a los agentes etiológicos en cultivos celulares "in vitro" o en algún modelo experimental animal.

El descubrimiento que produjo grandes avances en el estudio de la fase virémica de la hepatitis por virus tipo "B" fué el realizado casualmente por Baruch S. Blumberg en 1964, en Philadelphia EUA. (7), cuando estaba investigando isoprecipitinas contra beta-lipoproteínas de sueros humanos en pacientes multitransfundidos; usando la técnica de doble difusión de Ouchterlony encontró, en un paciente hemofílico que había recibido muchas transfusiones un anticuerpo raro que reaccionaba con el suero de un aborigen australiano, pero no con los otros sueros incluidos en el panel. A ese antígeno Blumberg le llamó antígeno Australia (Ag Au), y fué encontrado en el 20% de los pacientes con hepatitis viral y posteriormente asociado sólo con la hepatitis por suero o sea la tipo "B".

El descubrimiento del antígeno Au, y de sus anticuerpos respectivos, así como su asociación --

con la hepatitis tipo "B", requirió nueva terminología por lo que la nomenclatura ha ido cambiando, ya que el nombre que le dió Blumberg de antígeno - Australia parece indicar una asociación de la enfermedad con ese país exclusivamente, de ahí que - en 1968, cuando Prince (8) la asoció con la hepatitis sérica, se le denominó "AgSH" o sea antígeno - de la hepatitis sérica; más adelante (1969) en la Universidad de Yale se demostró que este antígeno - sólo se encuentra en el suero, pues fué encontrado en otras personas que no habían recibido ninguna transfusión de sangre, por lo que se le dió - el nombre de AAH o sea antígeno asociado a la hepatitis; como este nombre tampoco era muy representativo, en 1972 el National Research Council de EUA. lo denominó antígeno de la hepatitis tipo "B", o sea AgHB que ya es más representativo; por último, el Comité sobre Hepatitis Viral del Consejo Nacional de Investigación - Academia Nacional de Ciencia de los EUA. propuso la siguiente nomenclatura - (ver cuadro No. 1); en el cuadro se explica el significado de los diferentes símbolos y términos en uso actual y aceptados internacionalmente.

Por lo que toca a los sub-tipos indicados en el cuadro No. 1, se sabe que "a" es una determinante antigénica común, y que hay una segunda determinante que puede ser "d" o "y", las cuales determinan el genotipo del virus. Se ha observado que es más común la determinante "ay" entre los norteamericanos, y la determinante "ad" se ha encontrado - más bien entre donadores de sangre Thaiandeses. - Se han hecho varios estudios por el método de inmu

nodifusión, usando como antígeno sueros purificados en gradiente de sacarosa o de cloruro de cesio, y también utilizándolos en la inoculación de animales para la preparación de los sueros anti correspondientes. Al observar que no todos los "ad" ni todos los "ay" eran idénticos (9, 10) Bancroft y colaboradores (9) y posteriormente Levene y col. (10) encontraron dos determinantes antigénicas más y las denominaron "w" y "r", resultando así los sub-tipos "adr", "ayr" y "ayw". Estas últimas observaciones se hicieron absorbiendo el suero anti-con antígenos heterólogos.

NOMENCLATURA Y TERMINOLOGIA RELACIONADA CON LA HEPATITIS VIRAL TIPO "B"

( Propuesta por el Comité sobre Hepatitis Viral del Consejo Nacional de Investigación y Academia Nacional de Ciencias de los EUA. )

- Ag<sub>s</sub> HB - Antígeno de la Hepatitis tipo "B" que se encuentra en la superficie de la --  
partícula Dane y en las otras partículas libres de 20 mm.
- Ag<sub>c</sub> HB - Antígeno de la Hepatitis "B" que se encuentra en el "Core" (corazón o centro)  
de la partícula Dane..
- Partícula Dane - Partícula de 42 mm. que contiene dos antígenos: Ag<sub>s</sub> HB y el Ag<sub>c</sub> HB.
- HVB - Virus de la partícula Dane, de la hepatitis tipo "B".
- Ag<sub>s</sub> HB/adr - Antígeno de la superficie de la hepatitis "B" con la expresión del deter-  
minante específico de grupo a, y las determinantes antigénicas específi-  
cas de subtipo, d y r (ejemplo).
- Anti-HB<sub>s</sub> - Anticuerpos contra el antígeno de superficie de la hepatitis "B". Si se -  
conoce la especificidad, las determinantes antigénicas deben indicarse desu  
pués de una diagonal (ejemplo: Anti-HBs/adr).
- Anti-HB<sub>c</sub> - Anticuerpos contra el antígeno c (del core).

SUB-TIPOS DEL HB<sub>s</sub> Ag.

HBsAg/ayw	(4 sub-tipos)
HbsAg/ayr +	
HBsAg/adw	(2 sub-tipos)
HBsAg/adr +	

## CAPITULO III.

" H E P A T I T I S   V I R A L E S "

## GENERALIDADES Y DIFERENCIAS.

Se sabe que cuando menos son dos los tipos - de virus causantes de las hepatitis virales. Ya - que hasta la fecha no se han podido aislar los agentes etiológicos causantes, para poder diferenciar - entre los dos tipos de hepatitis tenemos que basarnos en algunos aspectos clínicos como son: el pe--ríodo de incubación, que es diferente, ya que en - el caso de la hepatitis tipo "A" dicho período es - de 15 - 50 días con una media de 30 días, sin ha--cer caso de la ruta de infección ya que es esen--cialmente el mismo siguiendo a una exposición pa--renteral u oral (6). En contraste, el período de - incubación del virus de la hepatitis tipo "B" es - mucho mayor, entre 45 - 180 días, con promedio de - 90 días. Aunque la hepatitis tipo "B" es general--mente transmitida por la ruta parenteral, es bien--reconocido que también puede propagarse por contacto o por la vía oral (6).

Consecuentemente, una historia de exposición parenteral puede ser citada como útil para estable--cer el diagnóstico, pues si el período de incuba--ción es largo es casi seguro que la infección es - de tipo "B". Por otro lado, es difícil precisar - el tiempo de evolución si no hay antecedente de --inoculación.

Se puede diferenciar si se tiene conocimiento del tipo de cuadro clínico que presentó, ya que en el caso de hepatitis tipo "A" el ataque tiende a ser repentino, agudo, con fiebre alta, mientras que en el caso de hepatitis tipo "B" tiende a ser insidioso, con fiebre leve, y se puede caracterizar por un período prodrómico con urticaria, prurito y artritis en ocasiones.

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

Algunas pruebas de laboratorio pueden ser útiles para el diagnóstico diferencial de las hepatitis, como se ve en el cuadro No. 2.

Entre las pruebas auxiliares para la diferenciación entre una hepatitis "A" y una "B", tenemos la determinación de ambas transaminasas séricas -- (la glutámico-pirúvica y la glutámico-oxalacética), turbidez del timol, determinación de inmunoglobulinas, especialmente la IgM, y principalmente la detección del "AgSHB".

Transaminasas en sangre: Se alteran como se ve en el cuadro No. 2: ayudan a la diferenciación ya que en el caso de hepatitis tipo "A" se elevan antes de que aparezcan los síntomas clínicos, y en ocasiones es el único dato presente que identifica a la enfermedad. Estos valores se normalizan a corto plazo y en promedio se ven alteradas no más de 3 semanas, en el caso de hepatitis tipo "A". En cambio, en la hepatitis tipo "B" las transaminasas se alteran lentamente y tienden a persistir al

DIFERENCIAS PRINCIPALES ENTRE LAS HEPATITIS VIRALES.

	<u>HEPATITIS "A"</u>	<u>HEPATITIS "B"</u>
Período de Incubación	De 15 a 50 días	De 45 a 180 días.
Vías de Transmisión: Más Común:	ORAL	PARENTERAL.
Ocasional:	PARENTERAL	ORAL.
Curso Clínico	BENIGNO	PUEDA SER GRAVE
Complicaciones graves	RARA VEZ	± 10% de casos.
Mortalidad	CERCANA A 0%	± el 10 %.
Detección del Ag <sub>s</sub> HB	NO PRESENTE	PRESENTE DURANTE LA INCUBACION Y EN FASE AGUDA, PERSISTE LARGO TIEMPO EN PORTADORES SANOS.
Niveles Anormales de TSGO y TSGP	De 1 a 3 semanas.	De 1 a 8 meses o más.
Tipo de ataque	USUALMENTE AGUDO	USUALMENTE INSIDIOSO.
Otros Nombres	HEPATITIS INFECCIOSA HEPATITIS EPIDEMICA	HEPATITIS SERICA, POR SUERO HOMOLOGO, POSTRANSFUSIONAL.
Niveles de IgM y TURBIDEZ DE TIMOL.	USUALMENTE AUMENTAN CON ICTERICIA O SIN ELLA.	USUALMENTE NORMALES EN CASOS ANICTERICOS, EN CASOS ICTERICOS AUMENTAN.

tas por semanas o meses (transaminitis). De acuerdo a la técnica de Cabaud y Wroblewski las cifras - deben considerarse anormales por arriba de 40 U. - unidades. La alteración de transaminasas en hepatitis tipo "A" suele observarse con cifras mayores - que en el caso de hepatitis "B".

La turbidez del timol puede ser una prueba - útil para diferenciar las hepatitis, sobre todo -- cuando el paciente no está icterico, ya que en caso de tratarse de una hepatitis tipo "A", sea icterica o anictérica, los valores de turbidez del timol van a ser anormales (elevados), y por lo general permanecen normales en el caso de hepatitis -- "B" anictérica, aunque puede ser anormal en caso - de hepatitis "B" icterica; por lo tanto, no siempre es de utilidad.

Determinación de Inmunoglobulinas: Los niveles de la IgM en ambos tipos de hepatitis viral -- son esencialmente los mismos, como en el caso de - la turbidez del timol (11), ya que un aumento en - la turbidez del timol está correlacionado con un - aumento de la IgM.

Detección del "AgSHB": La especificidad del AgSHB en caso de hepatitis "B" ha sido bien documentado (12), y va a estar en relación con el subsecuente aumento en los niveles de TGO y finalmente con la aparición de la ictericia. El problema es que sólo una prueba positiva para la presencia del AgSHB puede ayudar en el diagnóstico de hepatitis tipo "B", ya que en el caso de una prueba negativa, esto puede deberse a que se trata de una he-

patitis tipo "A" o bien puede ser de tipo "B" sin-  
que el suero contenga en ese momento el "AgSHB", o  
estar éste en cantidades tan pequeñas que el méto-  
do empleado para su detección no sea suficientement  
te sensible.

## CAPITULO IV.

HEPATITIS VIRAL TIPO "B".

## CLASIFICACION DE ACUERDO A SU CUADRO CLINICO.

Dependiendo de las manifestaciones clínicas que se presentan durante la enfermedad, ésta se ha clasificado en hepatitis viral benigna cuando sigue el curso habitual, típico, y posteriormente el enfermo vuelve a la normalidad, o bien se considera como hepatitis viral severa cuando el paciente en vez de mejorar tiende a desarrollar una hepatitis crónica progresiva, y en la mayoría de los casos el desenlace es fatal: Ver cuadro No. 3.

1.- Hepatitis viral ordinaria o típica es el nombre que se le da a las hepatitis virales más frecuentes, que siguen un curso típico y benigno; en un 85 % de los casos se presenta una fase prodrómica de duración variable y que se caracteriza por fatiga y anorexia. En la fase preictérica hay fiebre, nunca mayor de 39°C, calosfríos, cefalea y manifestaciones de tipo catarral agudo o gastrointestinal con sensación de pesadez en área hepática. El hígado se encuentra aumentado de volumen y se palpa abajo del borde costal en dimensiones variables: puede presentarse diarrea o estreñimiento, náuseas y/o vómito. Durante esta fase, que en promedio dura una semana, se observa coluria e hipocolia o acolia.

La fase ictérica se presenta en forma variable y en general afecta desde un principio a las -

CUADRO No. 3

VARIANTES CLINICAS DE LA HEPATITIS VIRAL.

ESPECTRO CLINICO

ESPECTRO HISTOLOGICO.

ENFERMEDAD BENIGNA.

Hepatitis viral ordinaria típica.

Hepatitis Anictérica.

Hepatitis Colestática.

Hepatitis Recurrente.

Hepatitis Crónica Persistente.  
(transaminitis).

HEPATITIS CLASICA.

ENFERMEDAD SEVERA.

Hepatitis Anictérica.

Hepatitis Crónica activa "agresiva"

Hepatitis Fulminante.

NECROSIS HEPATICA  
SUBAGUDA.

conjuntivas; en ocasiones es discreta y parece no progresar; sin embargo, en la mayoría de los casos, 3 a 5 días después la ictericia es notoria en piel y mucosas. Al aparecer la ictericia, la fiebre desaparece, así como otros signos y síntomas más o menos inespecíficos. La ictericia alcanza su máximo entre el día 10 y 14 de la fase ictérica. El hígado está crecido y ligeramente doloroso, el bazo se palpa en uno de tres a cinco pacientes, la ictericia es intensa y las evacuaciones pueden ser aun hipocólicas. A partir de este momento la ictericia empieza a declinar y 2 a 4 semanas después toda la signología ha desaparecido.

En ocasiones la etapa ictérica es de más corta duración y puede incluso desaparecer a los 3 a 5 días de iniciada. La fase postictérica, con duración de 4 a 8 semanas, se caracteriza por la normalización de la signología mencionada anteriormente; el paciente muestra apetito, sin embargo, puede tener signos de fatiga fácil, malestar difuso, alteraciones gastrointestinales y el hígado puede aún ser palpado y ligeramente doloroso. Pero la enfermedad es benigna y el paciente se recupera -- pronto.

2.- Hepatitis Anictérica es una variante de la hepatitis viral en la que no se presenta ictericia, y el diagnóstico se sospecha cuando el paciente presenta una sintomatología de hepatitis, si estuvo en contacto con algún enfermo, durante una -- epidemia, o bien se comprueba mediante un estudio-histopatológico en una biopsia hepática. Se ha calculado que el 30% de los casos de una epidemia son

anictéricos. También se han encontrado casos de hepatitis anictérica en población aparentemente sana. La sintomatología de estos casos es vaga, relatándose en ocasiones un curso de 5 a 7 días con manifestaciones digestivas, fatiga y anorexia. En uno de cada tres a cinco pacientes se puede encontrar crecimiento hepático. El nivel de las transaminasas séricas es alto, puede haber bilirrubinas conjugadas en orina y la carga de bromosulfaleína no es depurada dentro del tiempo normal.

El diagnóstico definitivo es histopatológico, en el que se demuestran las lesiones típicas de la hepatitis aguda. En algunas ocasiones puede presentarse hepatitis anictérica, pero crónica, agresiva, por lo que se vuelve severa y con desenlace fatal.

3.- Hepatitis Recurrente, también está clasificada dentro de las benignas, aunque puede llegar a convertirse en crónica progresiva; el curso de esta hepatitis es prolongado pero el paciente presenta signología de varios brotes agudos con ictericia coluria, acolia, o hipocolia y fiebre. El hígado continúa crecido y doloroso. Cuando se toman biopsias en los diferentes estadios, se observa -- una imagen histopatológica semejante a la del cuadro agudo inicial. La frecuencia de este tipo de evolución es variable y va del uno al 15%, y la recuperación en la mayoría de los casos es completa.

En ocasiones, un paciente que había mostrado durante una o dos semanas un cuadro con subictericia bruscamente desarrolla aumento en los fenómenos colestásicos. Estos casos pueden ser considerados de evolución mixta: recaídas y tendencia a -

prolongarse.

4.- Hepatitis Prolongada, Crónica Persistente. Con esta connotación se designa a la hepatitis que sigue un curso prolongado que puede extenderse hasta por seis meses e incluso por más tiempo. El fenómeno fundamental es colangitis y la expresión-clínica es de colestasis importante. A pesar de que la ictericia puede alcanzar cifras de bilirrubinas mayores de 20 mg/100 ml., el paciente no muestra signos de actividad o progresión del daño-hepático, e incluso la evolución inicial del cuadro agudo es semejante al descrito para los casos de evolución típica. En las dos o tres semanas iniciales, el paciente gana peso y sólo manifiesta ictericia y hepatomegalia discretas.

El diagnóstico puede ser realizado cuando se tiene el antecedente de un cuadro previo, o bien en casos que corresponden a brotes epidémicos. En un buen número de casos es necesario recurrir al estudio del material hepático obtenido por punción biopsia. Este tipo de hepatitis viral se clasifica dentro de las benignas, ya que aunque con tiempo más prolongado el paciente se recupera.

5.- Hepatitis Progresiva, Fulminante.- Con este término se designa la enfermedad que puede tener un curso progresivo y fatal rápido. En el primer caso el cuadro se considera subagudo, el paciente continúa sintiéndose enfermo, puede presentar manifestaciones digestivas o respiratorias, fiebre; la hepatomegalia y la esplenomegalia no tienen tendencia a mejorar si no por el contrario,

en menos de tres meses el paciente muestra síntomas de insuficiencia hepática. La letalidad de estos casos es alta y en caso de supervivencia la recuperación es muy lenta, quizá dos años, pero nunca es total la recuperación.

Cuando el proceso hepático se desarrolla rápidamente las manifestaciones clínicas son verdaderamente aparatosas; el paciente se muestra severamente afectado con fiebre alta, pálido, icterico, con manifestaciones hemorrágicas y alteraciones del estado de conciencia que pueden ir desde la inquietud, irritabilidad y delirio hasta el coma. Más del 90 % de los pacientes que presentan este tipo de evolución, fallecen dentro de la primera semana de iniciado el cuadro progresivo de insuficiencia hepática.

## ASPECTOS INMUNOLOGICOS:

Por las razones que ya se indicaron anteriormente, en particular las grandes dificultades que ha presentado el cultivo in vitro de los virus que causan hepatitis, los avances en el conocimiento - de ciertos aspectos inmunológicos ha sido bastante lento. En el caso de la hepatitis por virus "B" - el período de incubación tan largo y variable es - un factor que frecuentemente enmascara la realidad inmunológica en los individuos infectados, y constituye la explicación a una limitación no superada aún de toda la metodología para la detección del - "AgsHB", que es la posibilidad de detectar alrededor del 50 % de los individuos infectados, en un momento dado. En otras palabras, debido a que ningún método en uso actualmente es capaz, independientemente de su sensibilidad, de reconocer a la gran mayoría de los individuos infectados, el panorama inmunológico y epidemiológico resulta necesariamente incompleto.

Otro aspecto inmunológico de particular interés y que hasta ahora no ha sido debidamente explicado es el que se relaciona con la incidencia relativamente elevada de seropositividad al "AgsHB" en individuos con ciertos padecimientos como el Síndrome de Down (13), la leucemia (14), lepra lepromatosa (15), lupus eritematoso sistémico (16), diabetes (17). Tal parece que ciertos estados de incompetencia inmunológica favorecen de alguna manera la infección o la persistencia del antígeno circulante, y se ha pensado en una posible tolerancia

inmunológica parcial o completa hacia ese antígeno, lo cual condicionaría una predisposición al estado de portador.

El individuo con antigenemia persistente - - constituye un caso singular como fuente de transmisión de este agente causal, ya que está plenamente confirmada la posibilidad de transmisión por diversos mecanismos que ya fueron mencionados con anterioridad. Este problema plantea con mayor urgencia la necesidad de desarrollar métodos preventivos eficaces, que por ahora se reducen a las perspectivas que se desprenden de los experimentos de Krugman (18) y de Prince (19), de los cuales se darán más detalles en el capítulo de prevención.

### ETIOLOGIA:

No se ha podido aislar el agente etiológico de la hepatitis tipo "B". El diagnóstico por el laboratorio se basa en la detección del "Ag<sub>s</sub>HB", - pero es necesario recordar que los resultados negativos no son concluyentes, por las razones expresadas en el capítulo sobre aspectos inmunológicos. - Es por ello que siguen siendo de utilidad algunas pruebas de funcionamiento hepático; en términos generales, se acepta que existe una correlación bastante definida entre el grado de daño al hepatocito por el virus tipo "B" y el grado de anormalidad de las pruebas funcionales hepáticas.

El aislamiento de otros tipos de virus de -- los grupos ECHO, Coxsackie, Adenovirus, Reovirus, -

de virus de influenza y de citomegalovirus en individuos con padecimientos diagnosticados como hepatitis virales, podría indicar desde una coincidencia sin relación etiológica directa hasta la posibilidad no demostrada de que tales virus sean capaces de producir verdaderas hepatitis virales. Sin embargo, no hay evidencias claras de esto último y, en cambio, las hay numerosas e incontrovertibles - de que solamente los virus tipo "A" y "B" son capaces de producir hepatitis virales, al menos de acuerdo a los cánones histopatológicos.

Se ha pensado también en la posibilidad de que existan variantes antigénicas del virus tipo "B" capaces de provocar cuadros de repetición al resultar inefectiva la protección inmunológica con ferida por una variante antigénica.

### EPIDEMIOLOGIA:

Se ha llegado a la conclusión de que la hepatitis viral tipo "B" se transmite tanto por vía parenteral como por la vía oral, siendo las principales fuentes de contaminación los portadores asintomáticos y los casos anictéricos.

Entre las varias formas en que puede realizarse la transmisión del virus tenemos la vía parenteral principalmente, pero también puede ocurrir por la vía oral, por contacto con descarga menstrual, en forma venerea, por el uso de cepillos de dientes, navajas de rasurar e instrumentos dentales contaminados, por rasguño o pinchazo con-

agujas contaminadas por pacientes con AgsHB, y seguramente en otras formas también.

La transmisión por vía transfusional ha sido quizá una de las más frecuentes, y también han sido reportados casos aislados y epidemias en unidades de diálisis, muy probablemente debidas a esterilización inadecuada de materiales que entran en contacto con la sangre del enfermo.

Además de la sangre hay otras secreciones o excretas que pueden contener el antígeno, como la materia fecal, orina, saliva, bilis, semen, de acuerdo a los reportes de Grob (20) y de Ferris (21).

La transmisión del AgsHB con orina es posible por personas con transplantes renales que llegan a convertirse en portadores crónicos del Ag y lo siguen excretando por la orina. En el Royal Free Hospital de Londres y en Wellcome Research Laboratories de Beckenham también han detectado el antígeno en la orina, no sólo en pacientes con AgsHB positivo sino también en la orina de personas aparentemente sanas y que no tenían AgsHB detectable en suero (22) y (23).

Por otro lado, Aklamar y colaboradores (24) demostraron el AgsHB en la bilis de uno de cinco individuos con antigenemia; más recientemente Alpy y Wrigh (25) reportaron el hallazgo de AgsHB por microscopía electrónica y por inmunoelectroforesis en la bilis de un paciente que era portador crónico del antígeno en su sangre.

Diversas pruebas serológicas de escrutinio y

estudios epidemiológicos han puesto en claro que - la prevalencia de donadores con AgsHB detectado en sus sangres varía grandemente de país a país y aún en diferentes áreas de un mismo país. Debido a -- ello los bancos de sangre deberían ser más estrictos en la selección de los donadores, ya que estos muchas veces niegan síntomas de hepatitis, sobre - todo los que reciben paga, y aquí se incluyen a alcohólicos, adictos, convictos.

### PATOLOGIA:

Poco se sabe sobre la patogénesis de esta enfermedad; sin embargo, se supone que el virus compromete directamente la función del hepatocito y - que el resultado de esta agresión puede ser originada por un mecanismo autoinmune.

Las lesiones histopatológicas son sistémicas; sin embargo, el hígado es el órgano en el cual la enfermedad tiene su máxima expresión tanto clínica como histopatológica.

Mediante biopsias hepáticas obtenidas en diferentes etapas de la enfermedad se ha observado - que la lesión inicial es en el hepatocito, el cual se ve hinchado con tendencia a la degradación vaacuolar; hay degeneración y necrosis de los hepatocitos con ruptura de las láminas hepáticas, exudado inflamatorio mononuclear, intralobulillar y periportal.

Algunos hepatocitos se aprecian colapsados - con escaso citoplasma acidófilo. Estas células pro

bablemente dan origen a los cuerpos acidófilos intrasinusoidales o dentro de las células de Kupffer. La presencia de estos cuerpos acidófilos es característica de hepatitis aguda, pero no es patognomónica, puesto que puede presentarse en cualquier -- otra alteración hepática que se acompañe de necrosis celular.

La presencia brusca de necrosis de los hepatocitos altera las láminas hepáticas conduciendo a desarreglo del patrón lobulillar; las células de Kupffer se encuentran aumentadas en número y tamaño y con alto contenido de material PAS-positivo -- producto de la fagocitosis de lipofuscina.

Las lesiones que se han descrito pueden progresar rápidamente en cuestión de días y ser causa de muerte del paciente o bien, como sucede en la -- gran mayoría de los casos, se inicia tempranamente la regeneración celular y reparación del daño.

Se considera que el tiempo que tarda en recuperarse la lesión histopatológica varía de 2 a 3 -- meses; sin embargo, hay ocasiones en que puede observarse infiltrado mononuclear discreto peripor-- tal durante meses. Lo importante es que en estos -- casos los fenómenos residuales no se acompañan de fibrosis o de alteraciones de la lámina de los hepatocitos.

## TRATAMIENTO.

No existe hasta la fecha un tratamiento específico para esta enfermedad. Más del 90 % de los casos tienen un curso benigno, esto es, que sanan en 3 a 6 semanas. Sin embargo, durante la fase -- aguda del padecimiento es conveniente cierta restricción de actividades, aunque a los niños es difícil mantenerlos en reposo absoluto. Como se había mencionado, en la 1a. y 2a. semanas de la enfermedad domina en el cuadro clínico la astenia, - de tal forma que el propio paciente limita sus actividades, siendo un "termómetro" de su recuperación el aumento progresivo de sus actividades.

El tipo de dieta en la gran mayoría de los - casos no debe ser objeto de modificaciones. En los niños se abusa de los consejos populares de administrar gran cantidad de carbohidratos en la dieta, pero eso puede llegar al grado de producir intolerancia en el paciente. En otros casos es suficiente con disminuir las grasas y los alimentos muy -- condimentados. No se ha probado la eficacia de las llamadas "drogas hepatoprotectoras" como los derivados de la colina, metionina, inositol, vitamina-B 12, etc.

Los pacientes cuyo curso de la hepatitis tenga tendencia a prolongarse o bien presenten complicaciones derivadas de la insuficiencia hepática, - deberán ser sometidos a:

a).- Reposo absoluto en cama; se ha demostrado que el reposo es un recurso de valía que mejora el flujode la glándula e impide mayor sobrecarga por es- fuerzo.

b).- Esteroides; sólo en algunos casos de hepatitis prolongada grave se emplean, por sus propiedades anti-inflamatoria e hidrocolerética. Por lo general la dosis útil es de 2 - 3 mg. de prednisona o equivalentes x Kg. de peso por día durante 7- a 10 días, ya que la administración por tiempo más prolongado condiciona una serie de fenómenos colaterales de los esteroides.

c).- Administración de soluciones por vía intravenosa; se recomienda en los casos de insuficiencia hepática grave, ya que se presentan hipoglicemia y acidosis. Para corregir la hipoglicemia se usa solución salina glucosada al 5 - 15% y en casos de acidosis se utiliza solución de bicarbonato de sodio.

### PREVENCION Y CONTROL.

En hepatitis sérica, el uso de la globulina-gamma es ampliamente discutido. Se han mencionado dosis que son inaceptables desde un punto de vista práctico. Según Gell y colaboradores, la administración de esta gamma-globulina debe hacerse lo más pronto posible, para obtener una mejor protección, a dosis de 250 a 750 mg. para niños menores de 10 años y de 500 a 1500 mg. para los de más edad (26).

Aunque no se ha comprobado la eficacia de la gamma-globulina en el tratamiento o prevención de la hepatitis tipo "B", se ha hecho común su uso, ya que al parecer es efectiva para prevenir o atenuar la severidad de infecciones por virus tipo "A".

Algunos investigadores han utilizado la globulina gamma para prevenir hepatitis postransfusional con éxito aparente; otros están realizando estudios con globulina hiperinmune con altos títulos de anticuerpos contra el AgsHB, aunque hasta el momento no se ha confirmado la capacidad protectora de esos anticuerpos contra el desarrollo de la hepatitis tipo "B" (27).

Por el contrario, entre las medidas preventivas principales está la de excluir a los donadores de sangre que contengan el AgsHB o sus anticuerpos respectivos, ya que el primero sería potencialmente peligroso, mientras que los segundos indican -- que el individuo tuvo contacto con el AgsHB o que quizá sigue infectado.

Es probable que el método más efectivo de -- prevención sea la "inmunización activa" contra la hepatitis viral tipo "B".

Entre los relativamente pocos trabajos sobre inmunización activa tenemos los de Krugman, (28) -- quien la ha llevado a cabo en chimpancés, mediante la inoculación de un preparado de suero con AgsHB-diluido en agua destilada y calentado a 98°C, durante un minuto para conservarlo inmunogénico pero no infeccioso. Una inoculación confiere bastante-protección, pero lo ideal es recibir 3 inoculaciones con intervalo de 2 meses.

Aunque la inmunización activa contra la hepatitis tipo "B" está en fase experimental, se espera que en un futuro no lejano se obtendrá una vacuna efectiva para su prevención.

## CAPITULO V.

" AGENTE CAUSAL ".CARACTERISTICAS DEL "Ag<sub>s</sub>HB"

Debido a la falta de un medio adecuado de -- propagación, hasta la fecha no se ha podido aislar ni multiplicar ninguno de los virus causantes de las hepatitis, ni el de la tipo "A", ni el de la tipo "B". Como consecuencia, los investigadores -- han tenido muchos tropiezos para estudiar sus propiedades y características virológicas e inmunológicas, debido a que los estudios sólo han podido -- realizarse con seres humanos voluntarios y en algunas especies de primates, con sus respectivas desventajas.

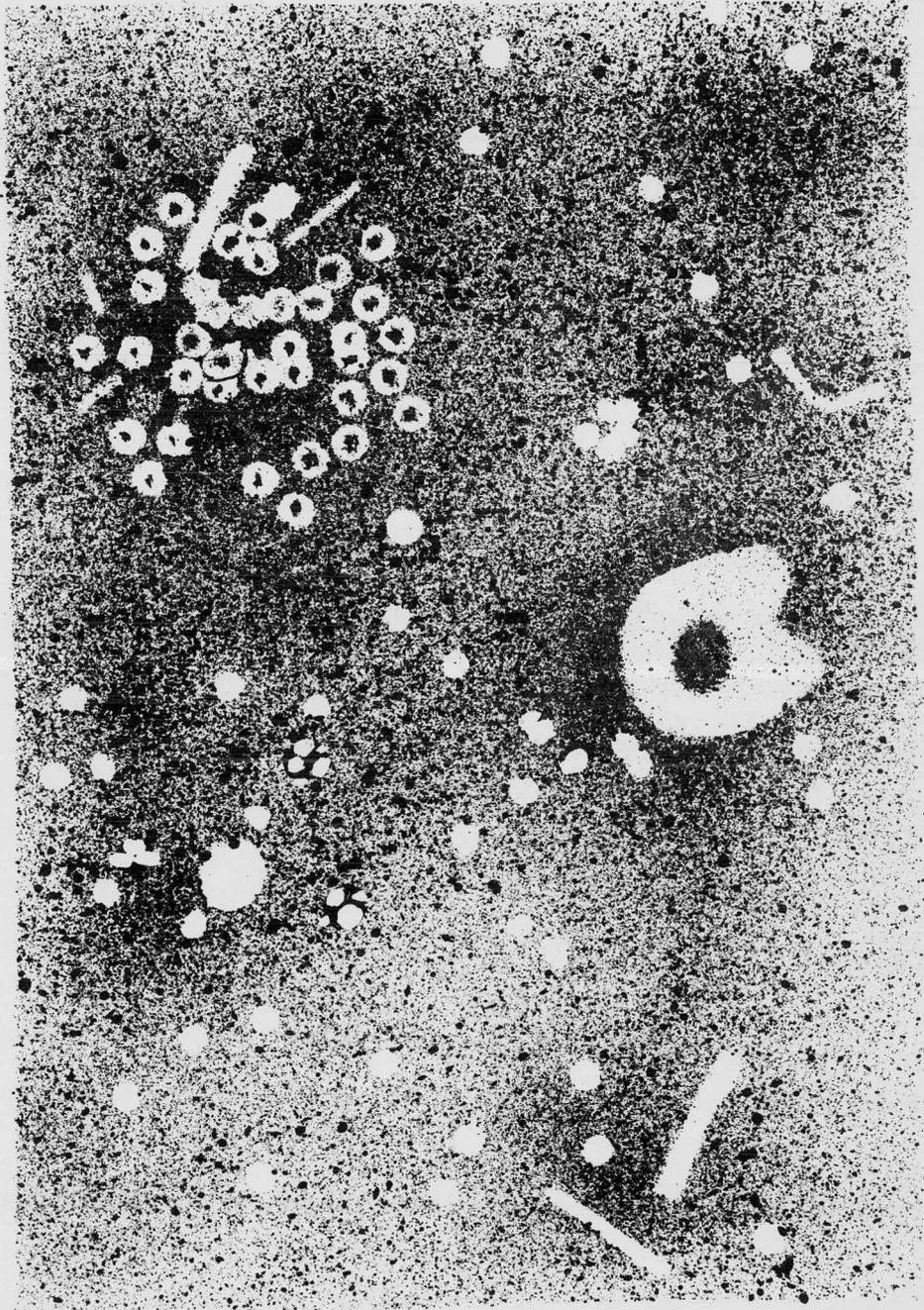
Los principales estudios morfológicos de las partículas virales se han hecho por observación directa de sueros de pacientes con hepatitis aguda y que han dado prueba positiva para el Ag<sub>s</sub>HB, y también en sus biopsias de hígado.

Las partículas observadas presentan características virales. Para la observación del suero se lleva a cabo una purificación previa por medio de ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa, separación en columna de intercambio iónico y digestión enzimática. Las partículas observadas con tinción negativa tienen diversa morfología, mostrando tres tipos de partículas que difieren en tamaño, y que se han descrito como sigue: partícu-

las pequeñas que tienen un diámetro de aproximadamente 22 nm pero con límites de 16 - 25 nm, con forma más bien esférica pero que a veces tiene forma de estrella, corona y en ocasiones es ovoide -- (tal vez por acción de los fijadores); formas tubulares, de varios cientos de nanómetros de longitud, y que generalmente muestran turgencias bulbosas en uno o en ambos extremos de los túbulos; partículas también esferoidales que miden alrededor de 42 nm de diámetro, con un cuerpo central de aproximadamente 28 nm de diámetro y dos cubiertas, una de 2 nm y otra de 7 nm de espesor. (ver foto)

Mucho se ha especulado sobre estos tres diferentes tipos de partículas, sobre todo de las esferoidales de 42 nm de diámetro, a las que Dane y colaboradores (29) confirmaron las propiedades antigénicas y sugirieron que sería el propio virus de la hepatitis tipo "B", en tanto que las formas tubulares serían sólo excedente de material de la cubierta viral.

Aunque no ha sido plenamente confirmado que las partículas de 42 nm que se observan en el suero de pacientes con hepatitis tipo "B" sean en realidad los virus causantes de la enfermedad, existen varios reportes que así lo indican: se ha dado el nombre de partícula Dane a toda la partícula -- (42 nm), y al cuerpo central de ésta, que mide -- aproximadamente 28 nm se le conoce como core (corazón), y de ahí las denominaciones de "AgcHB" y -- "AgsHB"; además, se han llevado a cabo estudios para ver si esos antígenos muestran una actividad inmunológica diferente en animales de laboratorio --



(cuyes), y se ha encontrado que en efecto se produce una respuesta humoral con formación de anticuerpos anti-AgchHB o de anti-AgsHB según sea el tipo de antígeno inoculado. La presencia de anticuerpos anti-AgchHB en un paciente puede ser un indicio de que se trata de un portador crónico del AgchHB.

Por observación al microscopio electrónico - se han conferido a la partícula Dane de 42 nm (29) características morfológicas de virus, y recientemente se ha asociado la actividad de una ADN polimeraza con el AgchHB (30, 31).

Otro aspecto importante y que hay que tomar en cuenta es el del mosaicismo antigénico que presenta; el antígeno de superficie está asociado - esencialmente a las partículas pequeñas, que probablemente constituyen los nucleocápsides de la partícula Dane, y posee las especificidades antigénicas que ya se mencionaron antes. Sin embargo, su aplicación y su utilidad no han sido bien definidas aún, excepto por lo que toca a la determinación de su distribución en diferentes grupos humanos o regiones ecológicas.

El AgsHB es una proteína con cantidades variables de lípidos y su movilidad inmunolectroforética es similar a la de la alfa-1-globulina; su densidad es intermedia entre la de las lipoproteínas séricas y la mayor parte de las proteínas; en cloruro de cesio la densidad de las fracciones con actividad antigénica es de 1.20 a 1.21 g/ml. y de 1.16 a 1.18 g/ml. en sacarosa.

El coeficiente de sedimentación es de 110 S,

aunque han sido reportados valores más bajos (32).

Alarcón-Segovia (33) llegó a pensar que el AgsHB es una proteína sérica genéticamente determinada, debido a su movilidad electroforética con -- las alfa-1-globulinas y a que aparece en el pico -- de exclusión en la cromatografía.

Józwiak y colaboradores (34) encontraron -- aproximadamente un 5 % de ARN asociado al antígeno AgsHB purificado, pero no fué detectado ADN.

Hirschman y colaboradores (35) detectaron -- una ADN polimerasa ARN dependiente en un concentrado de AgsHB por medio de ultracentrifugación, de -- un suero de paciente con AgsHB positivo. Sin em-- bargo, no se detectó ARN en el concentrado de antígeno, y aún cuando se ha deducido de estos resultados que el AgsHB está asociado con un ribovirus, -- resulta de la mayor importancia establecer que la especificidad de esa enzima es diferente de la que pudiera encontrarse en las células-huésped.

Almeida y colaboradores (36) relacionaron el AgsHB con las características de un Arbovirus, con componente de ARN y transmitido por artrópodos, lo cual significó un paso más para identificar al antígeno con un virus. Posteriormente, en un trabajo de Prince (37), fué aislado el AgsHB en 28 de -- 187 mezclas de mosquitos capturados en Africa (Kenia y Uganda); el antígeno fué demostrado por la -- técnica de RIA, y las muestras correspondieron a -- ocho diferentes variedades de artrópodos. Con esto se confirma lo que ya pensaba Almeida, que este antígeno podía ser transmitido por artrópodos. Adede

más, estos datos nos pueden ayudar a deducir por-- que hay una prevalencia mayor de AgsHB entre las personas que habitan en los climas tropicales, si asociamos la presencia de una gran variedad de artrópodos en estas zonas.

No obstante, Skihoj piensa que además de la participación de los artrópodos ya observada por - Prince, hay que tomar en cuenta los aspectos higié- nicos y el ambiente social, ya que en áreas como - el Polo Norte en donde los artrópodos son escasos- y sólo se presentan durante algunos meses del año, la hepatitis tipo "B" es endémica en la región - - (150 por 100,000 habitantes).

Pero lo más importante de las propiedades -- del virus de la hepatitis tipo "B", o sea del AgsHB, es que es altamente estable; como se ve en los cua- dros 4 y 5, la reactividad inmunológica no es afec- tada por calentamiento a temperaturas relativamen- te bajas; se requieren 20 minutos de ebullición o- temperaturas de autoclave para inactivarlo.

Resiste la congelación y la descongelación - (hasta por 40 veces); la putrefacción (por contami- nación de 4 semanas a temperatura ambiente) no pro- duce ningún cambio en el antígeno. El AgsHB resis- te a pH muy ácido de 2 - 2.5, tres horas a 37°C, o a pH muy alcalino como de 9 - 10, durante tres ho- ras a 27°C; resiste al tratamiento con 1 mol/lit de HCl o por 6 mol/lit de NaOH, y también el tratamien- to con varias enzimas catabólicas. Un pretrata- - miento del antígeno purificado, con dodecil-sulfa- to de sodio y eter etílico, hizo al AgsHB relativa

mente sensible a la digestión proteolítica (38).

Aunque en el cuadro No. 5, no está reportado el efecto de la Beta propiolactona sobre la infectividad del AgsHB, parece ser que si la inactiva, ya que algunos laboratorios la adicionan a los controles positivos de AgsHB.

También se han empleado soluciones de formol para inactivar la infectividad del AgsHB.

CUADRO No. 4

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL AgsHB.

<u>TRATAMIENTO.</u>		<u>EFFECTO SOBRE LA INFECTIVIDAD.</u>	<u>EFFECTO SOBRE LA ANTIGENICIDAD.</u>
37°C	7 días	NINGUNO.	NINGUNO.
56°C	12 horas	NINGUNO	NINGUNO.
60°C	2 horas	NINGUNO	TITULO FC/4.
60°C	10 horas	INACTIVACION	TITULO FC/4.
98°C	1 min.	REDUCCION	PROTEINAS ALTERADAS TITULO FC/4.
Ebullición 20 min.		INACTIVACION	INACTIVACION.
121°C	15 min.	INACTIVACION	INACTIVACION.

Tomado de: Cossart Y.E. Epidemiology of serum hepatitis.  
Brit. Med. Bull Vol. 28 No. 2; 1972 pp. 160.

EFFECTO DE ALGUNOS AGENTES FISICOQUIMICOS SOBRE EL AgsHB.

<u>TRATAMIENTO:</u>	<u>EFFECTO SOBRE LA INFECTIVIDAD.</u>	<u>EFFECTO SOBRE LA ANTIGENICIDAD.</u>
Cloro a 10,000 ppm. por 30 min.	INACTIVACION	INACTIVACION
Formol al 1.5% 7 días	?	NINGUNO
Fenol al 2% 24 horas	?	NINGUNO
* Merthiolate (1:2,000)	NINGUNO	NINGUNO.
* Mostaza Nitrogenada 0.5 mg/ml.	NINGUNO	NO PROBADO.
* Luz U.V. 8 - 10 mw/seg/cm <sup>2</sup>	REDUCCION	NINGUNO.
* Beta-propiolactona 0.4 %	?	NINGUNO.
Dodecil-sulfato de sodio al 1% (P/v), 1 hora a temperatura ambiente.	NINGUNO	DESTRUYE
Dietil-éter 20% (P/v); a 4°C toda la noche.	NINGUNO	NINGUNO.
Dietil-éter 50% Al 50%, 2 horas a 0°C.	NINGUNO	NINGUNO.

Tomado de: Cossart Y. E. Epidemiology of serum hepatitis.  
Brit. Med. Bull Vol. 28 No. 2; 1972 pp:160.

\* (La autora no especifica el tiempo de acción de estos agentes).

### INTENTOS PARA REPLICARLO:

Se han hecho muchos intentos para aislar el "AgSHB" que se cree es el agente causal de la hepatitis tipo "B"; hasta el momento, aunque se han -- considerado fallidos todos los cultivos realizados en diferentes tejidos celulares, existen algunos - reportes alentadores. Entre ellos tenemos los tra**ba**jos de Brighton y colaboradores (39), quienes -- inocularon sueros positivos con AgSHB en cultivos-celulares de hígado humano y observaron una impli**ca**ción progresiva de los componentes de las célu--**la**s, apoyándose en el método de anticuerpos fluo--**re**scentes: primero el citoplasma, luego la membra**na** perinuclear y el nucleolo, en ese orden.

En otro trabajo, Carver y Seto (40) descu--**br**ieron la producción de áreas de hemadsorción ne**ga**tiva cuando se inoculó suero positivo con AgSHB, en células WI-38. Lo que se observó en este traba**jo**, fué que el suero humano infectado hacía a las células refractarias al virus de Newcastle, y que el uso de un antisuero contra el AgSHB prevenía la inducción del estado refractario para el virus del Newcastle.

Panouse-Perrin y colaboradores (41) han efec**tu**ado cultivos a largo plazo en tejido hepático hu**ma**no de niños (H.H), en tejido conjuntivo (fibro--**bla**stos humanos embrionarios F.H.E y de adultos F. H.A.) y en células K.B. Estos autores inocularon dichos cultivos con siete sueros diferentes, todos conteniendo el AgSHB y principalmente las partícu**la**s DANE. Se tripsinaron las células dos veces --

por semana, durante unos tres meses, y no se observó ningún efecto citopatogénico. Pero lo importante de este trabajo es que aunque no había ECP aparente, la observación al microscopio electrónico - de los líquidos de cultivo de las células H.H. y - F.H.E., a los quince días después de la inoculación, mostró unas estructuras icosaédricas con un diámetro entre 25 - 27 nm libres y/o en cúmulos -- densos, a menudo vacías con diámetro de 20 nm. -- Esas estructuras parecen constituidas por un conjunto de capsómeros de 5 nm de diámetro aproximadamente, en grupos de cuatro para formar una arista.

De las observaciones anteriores, se dedujo - que al parecer la partícula DANE se multiplicó en el cultivo, y para demostrarlo se hicieron varias pruebas inmunológicas, utilizando inmunoglobulinas específicas marcadas con isotiocianato de fluoresceína, para demostrar la presencia de antígenos virales en las células sometidas a cultivo.

Maurin y Corouce-Pauty (42), también en París, hicieron intentos para aislar el virus de la hepatitis "B" en células diploides humanas, para lo cual obtuvieron células de fibroblastos de piel de feto (la llamaron Lyon 1) y otras células de tejido pulmonar de feto (las llamaron Lyon 4). Se observó ECP en las células Lyon 4, después de la inoculación con material AgSHB positivo, pero utilizando otras la línea KB y cultivos primarios de riñón de mono, de amnios humano y de fibroblastos de embrión de pollo, inoculados con el mismo material, fracasaron en mostrar ECP.

El ECP en las células Lyon 4 se observó a --

los 10-12 días después de la inoculación, y no mostró características específicas. Los primeros pases en placas intactas frescas de Lyon 4 fueron satisfactorios y se observó ECP; el tercer pase se dificultó, ya que fué necesario un congelamiento y descongelamiento del material positivo, pero si se observó el ECP y así se llevaron a cabo varios pases y en una muestra se llegó hasta el pase # 19.- Desde luego que los pases se hicieron sin diluciones, ya que cuando se intentó hacer diluciones fracasaron.

También se intentaron experimentos de neutralización empleando diferentes sueros, sin éxito y no se observó neutralización excepto en una oca- - sión cuando se empleó suero de un paciente en esta do convaleciente, el cual neutralizó el ECP producido por su mismo suero; cuando contenía el AgsHB- o sea cuando estaba en fase aguda, se observó neutralización en una serie de diluciones hasta de -- 1:40.

Ademán se hizo otra observación que puede -- ser de utilidad en el trabajo de Maurin, ya que se observó que la capacidad de un suero positivo (con AgsHB) para producir el ECP no es afectada por incubación en presencia de 5 Bromo-2 deoxiuridina -- (BudR), lo cual sugiere que el agente responsable es posiblemente un virus ARN.

A pesar de los escasos y lentos avances en -- los intentos de replicación in vitro de este agente viral, se espera que eventualmente se encontrará algún procedimiento efectivo para ese objeto.

## IMPORTANCIA BIO-MEDICA.

Es de vital importancia el estudio del AgsHB, como único indicio que se tiene por ahora para tratar de prevenir una posible hepatitis viral, ya -- que es conocida la relativa frecuencia de portadores sanos, principal fuente de contaminación sobre todo cuando se trata de manejadores de alimentos o de personas que están en contacto directo con el público.

Principalmente los bancos de sangre deben tener un estricto control de los donadores de sangre, sobre todo de los profesionales ya que éstos siempre negarán haber tenido cualquier síntoma de enfermedad. Además, se deberá tener mucho cuidado con el manejo de sangre y de otros materiales biológicos en los laboratorios clínicos, ya que existe un alto riesgo de contaminación a partir de -- muestras clínicas.

La industria farmacéutica también deberá tener un estricto control si trabaja con materiales biológicos tales como sangre, en el caso de preparar globulina-gamma, albúmina, etc.

En los hospitales, el riesgo es mayor debido al constante manejo de enfermos portadores de estos virus, ya sea que presenten síntomas de hepatitis o no, y así se han reportado varios casos de -- epidemias intrahospitalarias, sobre todo en unidades de diálisis, en quirófanos, unidades de trasplantes de órganos, por manejo de enfermos con problemas de tipo hemorrágico, y otros casos hasta -- cierto punto difíciles de imaginar, tales como una

contaminación a través de una cortada en la piel, - por algún pinchazo accidental con aguja contaminada, etc.

Este riesgo puede reducirse aplicando medidas de prevención y de seguridad. El Centro para Control de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, EUA., publicó en 1973 (43) una serie de recomendaciones para la prevención y control de infecciones hospitalarias.

Sutnick y col. (44) han publicado las precauciones recomendadas para un laboratorio que realiza pruebas de Antígeno Australia en forma rutinaria.

### POSIBLES EFECTOS TERATOGENICOS.

Existen reportes de niños que han presentado la enfermedad a los pocos días de nacidos, en cuyos casos el período de incubación del AgsHB ha sido más corto que el usualmente reportado, por lo que se cree que esos niños se infectaron antes del parto. Pero el modo de transmisión del AgsHB a los niños recién nacidos no se conoce. Se han sugerido tres posibilidades: 1) transmisión transplacentaria "in utero", 2) contaminación oral con sangre de la madre al momento de nacer, o 3) transmisión oral post-partum de la madre hacia el niño como resultado de contacto directo.

La transmisión durante la lactancia con leche materna se ha excluído, ya que en muchas ocasiones la madre no ha alimentado al niño y además-

no se ha detectado el AgsHB en la leche.

Turner (45) concluyó que la infección del recién nacido puede ocurrir rápidamente durante el parto y que no hay necesidad de pensar en una transmisión transplacentaria. También se sugirió que la presencia del AgsHB en grupos familiares puede estar relacionada con algún factor genético. (46).

Existen algunos reportes en los cuales se ha implicado al AgsHB como posible agente teratogénico, por lo que se considera de vital importancia tener bajo control a la mujer embarazada, cuando se sospecha de una posible hepatitis viral; se ha reportado un caso en el que la madre no presentó ningún signo de hepatitis sino hasta el momento -- del parto, cuando se observó ictericia y elevación en las pruebas de funcionamiento hepático (bilirrubina y transaminasas); se le detectó el AgsHB en su sangre pero no se encontraron anticuerpos.

Al nacer el niño tenía peso normal, pero se observó labio leporino y paladar hendido; también se observó elevación de la IgM a los 10 días de nacido (58 % arriba del normal). Durante este tiempo no se detectó el AgsHB (por ID, ni por FC) pero -- fué detectado a las 8, 11, 22, 32 y 55 semanas de -- edad; los anticuerpos no fueron detectados.

No puede asegurarse, sin embargo, que estos efectos teratogénicos sean debidos precisamente al virus tipo "B", ni mucho menos que puedan presentarse en toda mujer embarazada que llega a infectarse con él.

## CAPITULO VI.

METODOLOGIA PARA LA  
DETECCION.

## CLASIFICACION Y GENERALIDADES:

En la actualidad, gracias al descubrimiento del AgsHB por Blumberg en 1964 y de la relación entre éste y casos de hepatitis viral, se ha podido detectar la presencia de portadores aparentemente sanos y así evitar en cierto grado la propagación de esta enfermedad. Siendo la detección del AgsHB el único indicio para prevenir la propagación de la hepatitis tipo "B", debemos estar concientes de -- que el uso de una técnica más sensible reduce el -- número de pruebas falsas negativas, por tal motivo se han ido depurando las técnicas para detectar el AgsHB (47, 48), y en la actualidad tenemos ya varios métodos en uso (ver cuadro No. 6), cuyos fundamentos son los siguientes (los métodos aplicados en este trabajo serán descritos detalladamente más adelante):

PRIMERA FASE: Tenemos el método de Inmunodifusión (ID), usado en un principio por Blumberg y que es la prueba de doble difusión en agar ideada por Ouchterlony, esta prueba se considera poco sensible y además tardada, obteniéndose los resultados en unas 72 horas. No obstante, se usó en este trabajo una variante del método de Ouchterlony, -- usando microtécnica, para la tipificación de grupos antigénicos del AgsHB, como se describirá más--

METODOS DE LABORATORIO PARA DETECTAR "Ag<sub>s</sub>HB" Y/O SUS ANTICUERPOS

<u>PRUEBA.</u>	<u>SIMBOLO</u>	<u>DETECTA</u>	
1a. FASE 0 GENERACION			
INMUNODIFUSION (doble difusión en agar, según OUCHTERLONY)	(ID)	Ag	Ac
2a. FASE 0 GENERACION			
REFORESIS	(ROF)	Ag	Ac
CONTRAINMUNOELECTROFORESIS	(CEF)	Ag	Ac
AGLUTINACION DEL LATEX	(AL)	Ag	--
FIJACION DE COMPLEMENTO	(FC)	Ag	Ac
3a. FASE 0 GENERACION			
HEMAGLUTINACION	(HA)	--	Ac
INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION	(IHA)	Ag	--
HEMAGLUTINACION REVERSA PASIVA	(HARP)	Ag	--
RADIOINMUNOANALISIS	(RIA)	Ag	Ac
INMUNO-ADHERENCIA HEMAGLUTINACION	(HAIA)	Ag	--

adelante, ya que la microtécnica tiene la ventaja de utilizar muy pequeñas cantidades de reactivos y de establecer la identidad entre sub-tipos.

SEGUNDA FASE: Las técnicas llamadas de segunda fase o generación como son la contraimmunoelectroforesis (CEF), la rheoforesis, la aglutinación del látex y la prueba de fijación de complemento (FC), han permitido avances importantes, ya que son más sensibles que la ID y se pueden obtener los resultados más rápidamente; tal es el caso de la CEF, con la cual se pueden obtener resultados en menos de dos horas. Otra ventaja de las técnicas de la segunda fase es que pueden ser aplicables a cualquier laboratorio porque no requieren recursos particularmente complicados o costosos.

El método de reoforesis es una modificación a la técnica de Ouchterlony, en la que los sueros problema se difunden sólo hacia el pozo central y prácticamente no hay difusión radial "hacia afuera", con lo cual se eleva la sensibilidad por aumento de concentración del material (antígeno o anticuerpo) que difunde hacia el centro (49).

La aglutinación de látex es una prueba de laboratorio muy simple, se obtienen los resultados muy rápido y con cierto grado de sensibilidad. Esta prueba era muy usada en un principio, pero se encontró que daba muchos resultados falsos positivos (50) principalmente cuando el suero problema contenía factor reumatoide. Parece ser que este problema ya ha sido resuelto, y actualmente los laboratorios Pfizer han sacado al mercado el Antigex<sup>TM</sup> Látex, que da buenos resultados y un mínimo de-

falsas positivas, pero no está en disponibilidad - en nuestro país.

La prueba de fijación de complemento es una de las técnicas más sensibles dentro de las de segunda generación, y permite no sólo identificar al AgsHB y/o sus anticuerpos respectivos sino también cuantificarlos. El único inconveniente de esta -- técnica para ser usada en la identificación del an tígeno de la hepatitis tipo "B" o de sus anticuerpos es la de presentar en ocasiones actividad anti complementaria, que puede ser debida a que en el suero problema estén presentes tanto el Ag como el Ac, con lo cual la reacción no puede ser representativa. La prueba de fijación de complemento será analizada más adelante con todo detalle.

TERCERA FASE: Dentro de éstas se encuentran las más actualizadas, como la de radioinmunoanálisis (RIA), considerada actualmente la más sensible y que permite detectar muy pequeñas cantidades de AgsHB y/o sus Ac, en diversos materiales biológicos como son orina, saliva, heces fecales, semen y por supuesto suero, plasma y sangre total. También se consideran dentro de este grupo las técnicas de inmuno-adherencia, hemaglutinación reversa pasiva y las de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación. Las pruebas de esta tercera generación tienen el inconveniente de que no se pueden - llevar a cabo en cualquier laboratorio, ya que requieren equipo y/o adiestramiento especializado. - Su sensibilidad las hace recomendables para evitar los resultados falsos negativos.

Las pruebas de hemaglutinación e inhibición-

de la hemaglutinación fueron estudiadas acuciosamente por Vyas y Shulman, en 1970 (51). La hemaglutinación provee un método altamente sensible para la detección de anticuerpos contra el AgsHB; la prueba es simple, sensible y puede ser efectuada en dos horas y se presta a automatización. Los eritrocitos son cubiertos con AgsHB purificado, usando cloruro crómico como agente de acoplamiento.

Los eritrocitos sensibilizados son mezclados con el suero, y si éste contiene anticuerpos (AcHB) se va a producir la aglutinación de los eritrocitos. Usando eritrocitos recubiertos adecuadamente, este método ha resultado muy sensible, según Ashcavai (52), quien ha encontrado títulos de 1:4 o mayor en el 12 % de sangres de la Cruz Roja de Los Angeles, en el 13 % del personal no laboratorista de un hospital y en el 39 % de los sueros de personal de laboratorio.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación (IHA) es útil para la detección del AgsHB, mediante el uso de eritrocitos cubiertos con antígeno. Los cuales van a neutralizar la cantidad de antígeno presente en el suero problema. Las diluciones seriadas del suero de prueba se mezclan con un volumen de anticuerpos standarizados, los que neutralizaran el antígeno, si se encuentra presente, y cuando se lleva a cabo la segunda fase de la reacción que es poner la mezcla anterior en contacto con los eritrocitos cubiertos con el AgsHB, ya no existirán Ac libres que aglutinen los eritrocitos cubiertos con el AgsHB. Uno de los inconvenientes de esta técnica es que el AgsHB usado para cubrir-

los eritrocitos debe ser altamente purificado. Es difícil prepararlo independientemente y es muy costoso comercialmente.

Posteriormente se ha observado que la IHA para la detección de AgsHB no ofrece ventajas en sensibilidad a la hemaglutinación reversa pasiva - -- (RPHA).

El fenómeno de la inmuno-adherencia fué primeramente descrito por Lavern Mesnil (53) y Levaditi (54). Posteriormente, Nelson (55) definió el principio general del complejo "Ag-Ac-C" adherido a eritrocitos de primates. La participación de -- componentes del complemento en la reacción de inmuno-adherencia-hemaglutinación (IAHA) fué descrita por Nishioka y col. (56) Este método detecta cantidades mucho más pequeñas que otras técnicas convencionales como son la de precipitación y la de - fijación de complemento.

Por el método de IAHA se detecta 0.0005 mi--crogramos de Nitrógeno de inmuno globulinas, mientras que el de precipitación sólo detecta 1.0 mi--crogramo, y el de FC. detecta 0.1 microgramo de Nitrógeno de inmuno globulinas. Otra ventaja de este método es que se puede emplear la microtécnica reduciendo así la cantidad de reactivos, y si además se emplea un microtitulador automático, se podría cuantificar AgsHB en muchas muestras por día. El fundamento principal de esta técnica es que si se tienen cantidades constantes de dos de las tres variables (antígeno, anticuerpo y complemento) se -- puede cuantificar la tercera variable.

Hemaglutinación reversa pasiva (HARP).- Es utilizada para la detección del antígeno de la hepatitis tipo "B", y es una de las técnicas de tercera fase que tiene la ventaja de ser relativamente más fácil de llevarse a cabo, casi tan sensible como RIA, y que puede llevarse a cabo con el mínimo de error y en menos de dos horas; uno de los in convenientes de esta técnica es (como se verá después) la necesidad de tener anticuerpos contra el AgsHB completamente puros.

Radioinmunoanálisis.- Es quizá el método más sensible para la detección del AgsHB. Da relativa mente pocas reacciones falsas positivas, y sus des ventajas principales son que es costoso y requiere equipo y adiestramiento muy especiales, además de ser laborioso y relativamente lento. Los detalles esenciales de las técnicas utilizadas en este trabajo se describen en el capítulo "Material y Métodos". (57)

## C A P I T U L O VII.

MATERIAL Y METODOS.

## MATERIAL BIOLÓGICO

OBTENCION DE MUESTRAS PARA PRUEBA:

La sangre colectada por venopunción se deja coagular naturalmente y el suero se separa por centrifugación antes de ser usado. Las muestras de plasma dan ocasionalmente resultados engañosos, -- dando aglutinación falsa con sueros negativos. Si es inevitable el probar una muestra de plasma, entonces deberá ser calentada primero a 60°C por 30 minutos y después centrifugada para remover el fibrinógeno coagulado. Si es necesario guardar las muestras antes de probarlas, deberán ser congeladas a -20°C para prevenir crecimiento microbiano.

PRECAUCIONES:

Al utilizar este material, así como cualquier otro con alto riesgo de contaminación, se deberá tener más precauciones en el manejo y en la esterilización de todo el material empleado. Los operadores deberán usar guantes y bata cuando efectúen la prueba. El área de trabajo deberá estar protegida por material de revestimiento desechable. Los aparatos no desechables se esterilizarán por procedimientos adecuados después de su uso, los desechables deberán incinerarse. Muestras accidentalmente derramadas de sueros sospechosos o de con

troles positivos, deberán ser inmediatamente removidas con un lienzo, y el área contaminada se limpiará con hipoclorito al 10%, antes de seguir trabajando. Aunque es improbable que el AgsHB se encuentre en los otros reactivos, de todas maneras - deberán ser usados con todas las precauciones necesarias y tratados como potencialmente infecciosos.

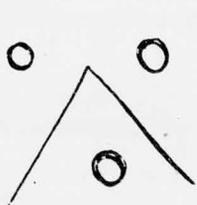
Los NIH establecen que toda reactivo de laboratorio de origen humano está controlado por la -- presencia de AgsHB, los controles + están adicionales de B propiolactona, pero no hay control sobre las muestras que se manejan en todo el laboratorio.

MICROMETODO DE OUCHTERLONY.

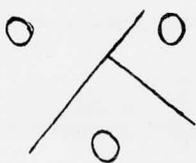
FUNDAMENTO:

Este método fué primeramente usado por Ouchterlony, y el que también usó Blumberg cuando descubrió - afortunadamente la presencia del AgsHB en un paciente-politransfundido, sólo que usando una variante en microtécnica.

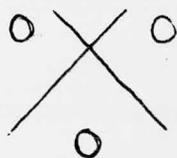
Pero el fundamento es el mismo, ya que se efectúa una inmunodifusión en dos dimensiones, sólo que en este caso se hace sobre unas placas de pequeño tamaño, en portaobjetos cubiertos con gel de agarosa; los pozos en los cuales se colocan la muestra y los reactivos son muy pequeños, lo cual viene a ser una ventaja. Las desventajas de esta técnica son que es la menos -- sensible para la detección del AgsHB, así como también el tiempo que se requiere para la observación de los resultados. No obstante, a pesar de ser la menos sensible y la más antigua, todavía se sigue usando debido a que es muy fácil de llevarse a cabo, y a que no se requiere de equipo especial. Además, es de gran utilidad cuando se requiere tipificar los antígenos y los anticuerpos, ya que se pueden observar las bandas de identidad, de identidad parcial y de no identidad con los sueros a probar, como se indica en el esquema de abajo.



Identidad



Identidad Parcial



No Identidad

Para intensificar líneas de precipitación débiles, es aconsejable poner especímenes de referencia con AgsHB positivos en los pozos periféricos - 2, 4 y 6 y las muestras problema en los pozos 1, 3 y 5. Entonces cada suero de prueba estará adjunto a los sueros positivos.

También es recomendable llenar primero los pozos correspondientes a los antígenos de prueba, - incubar por dos horas a temperatura ambiente antes de llenar los pozos con los sueros anti Ag; esto se hace con el fin de acelerar la interpretación de los resultados, ya que siendo las partículas de AgsHB moléculas más grandes en comparación con las de los anticuerpos (IgG), las partículas de AgsHB - difundirán más lentamente que las de los anticuerpos.

La observación de las placas se puede hacer en algunos casos a las 24 horas, pero en otras hasta las 72 horas o más. Se puede hacer la observación de las placas usando un microscopio estereoscópico, para poder hacer una mejor observación de la identidad de las muestras, y así tipificarlas debidamente. Para llevar a cabo esta tipificación se deberá tener sueros previamente tipificados, -- los cuales servirán de controles.

### MATERIAL:

Se emplean portaobjetos ordinarios, sobre los cuales se colocan unas placas especiales de acrílico, que ya tienen las horadaciones correspondientes, como indica el esquema; estas microplacas tie

nen un pozo en la parte central y seis en la periferia, cuyo diámetro es de 1.5 mm., y la distancia entre cada pozo es de 5 mm. La placa de acrílico-dista del portaobjetos aproximadamente 1.5 mm., lo cual se consigue con tela adhesiva enrollada de modo que queden fijas las dos bases; en la cavidad - que queda entre las dos bases se pone, utilizando una pipeta Pasteur y con mucho cuidado, evitando - formación de burbujas, una pequeña cantidad de gel de agarosa fundido, preparada como se indica más - adelante.

Las placas así preparadas se dejan solidificar bien, para lo cual se puede emplear una cámara húmeda para evitar que el gel de agarosa se seque.

### REACTIVOS:

1.- Los reactivos biológicos empleados en este estudio, fueron facilitados por el National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National -- Institutes of Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.

Catálogo	Reactivo	Fuente	Especificidad
V 801-002-027	Antígeno	Suero Humano	HBsAg/adw
V 801-502-058	Antisuero	Cobayo	anti-HBs/ad
V 802-001-027	Antígeno	Suero Humano	HBsAg/ayw
V 802-501-558	Antisuero	Cobayo	anti-HBs/ay
V 803-001-027	Antígeno	Suero Humano	HBsAg/adr
V 803-501-565	Antisuero	Conejo	anti-HBs/adr

Los antígenos de origen humano fueron purificados como describió Gerin y col. (58)

Los antisueros fueron preparados en cobayos por un procedimiento similar al descrito por Purcell y col. (59)

Los antisuero de conejo fué preparado por un procedimiento similar al descrito por Bancroft y col. (60)

## 2.- Solución amortiguadora de Veronal para las placas.

Se prepara una solución amortiguadora pH=8.6 y fuerza iónica.

Pesar 13.38 g de 5,5 dietil-barbiturato de sodio.

5.32 g de acetato de sodio anhidro; - adicionar 0.2 g de timerosal como conservador, aforar a 1.5 litros con agua destilada. Ajustar el pH a 8.6 usando HCl 0.12 N y luego aforar a 2 litros con agua destilada.

## 3.- Preparación de las placas.

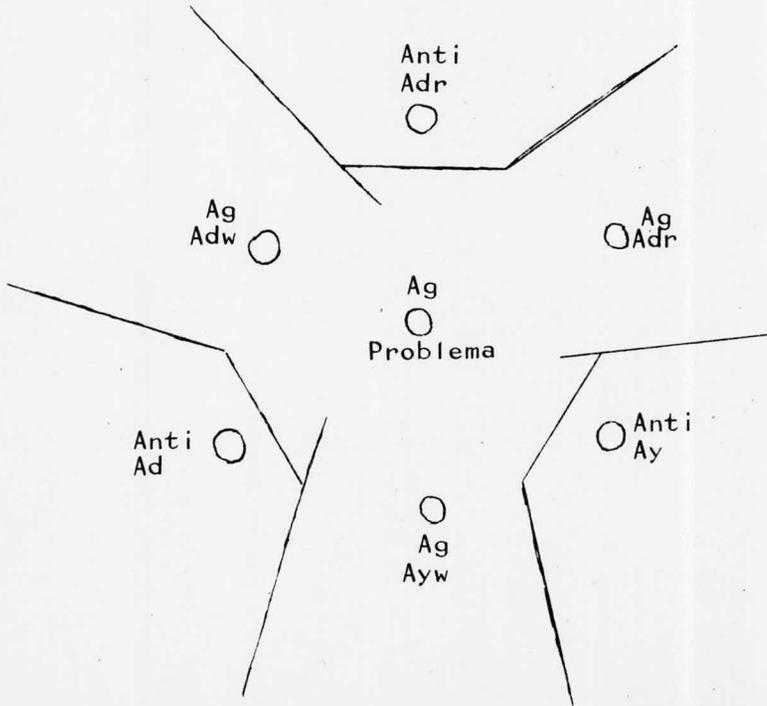
Se emplea gel de agarosa al 0.7%, en el buffer anterior; se pone a fundir en autoclave, y aún caliente se reparte en alícuotas en tubos de ensayo de 13 x 100 con tapón, de preferencia estériles. De esa manera es más fácil fundirla al momento de preparar las placas, para lo cual se ocupará un baño de agua hirviente.

Empleando una pipeta Pasteur y con mucho cuidado de no formar burbujas entre la placa y el portaobjetos se coloca el gel de agarosa fundida.

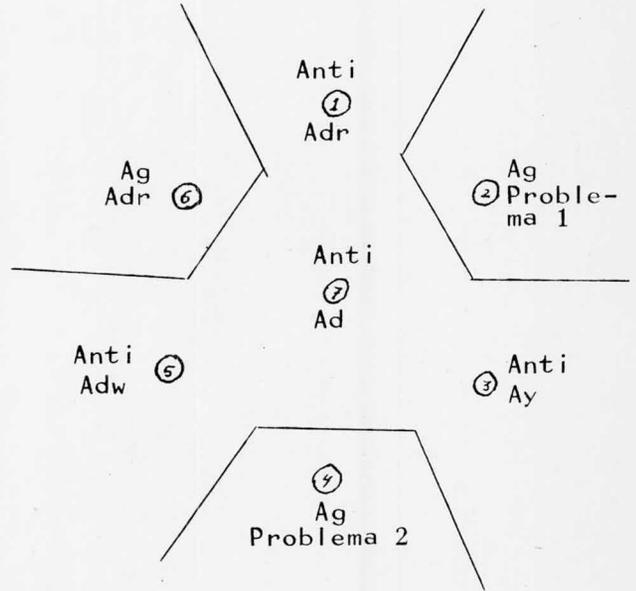
Ya solidificado el agar en las microplacas,-

se procede al llenado de los pozos con las muestras, teniendo cuidado de colocar un antígeno frente a un suero anti; con el fin de observar las bandas de identidad se pondrán en cada placa los controles respectivos. La posición de los sueros (antígenos y anticuerpos) ya tipificados, así como de las muestras problemas, puede variar dependiendo de la tipificación que se va a llevar a cabo; entre las opciones a seguir tenemos las siguientes. (ver esquema)

(A)



(B)



Lo importante es que las muestras-problema presenten las líneas de identidad bien definidas, para lograr así su tipificación.

El llenado de las microplacas se debe hacer con todo cuidado, para lo cual se emplean microcapilares, teniendo cuidado de descartarlos en cada ocasión (y de esterilizarlos antes de desecharlos).

Para la mejor observación de las bandas se emplea un microscopio estereoscópico y se coloca la placa sobre un fondo negro.

Se hace la observación de las placas a las 24 horas, a las 48 horas y 72 horas, pero se pueden dejar hasta 5 días cuidando que el gel de agarosa no se seque.

## METODO DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS.

### FUNDAMENTO:

Es el método más empleado en los laboratorios y bancos de sangre de pequeño y mediano tamaño para la detección del AgsHB, ya que aparte de ser más sensible que el de difusión en gel de agar, es más fácil de llevarse a cabo.

El método de contrainmunolectroforesis (CEF) fué aplicado con gran éxito por Bedarida y colaboradores (61) desde 1969.

El método se basa en el principio de que el "AgsHB" a un pH alcalino se encuentra cargado negativamente y emigra hacia el ánodo en un aparato de electroforesis. Por el contrario, los anticuerpos (gammaglobulinas) se hallan cerca de su punto isoeléctrico y tienden a moverse hacia el cátodo por fuerzas endosmóticas. Estas fuerzas oponentes producen una contramigración en un campo eléctrico, que mueve rápidamente al antígeno y el anticuerpo uno hacia el otro a través del gel de agarosa, produciéndose una concentración de reactivos y la aparición rápida de una banda de precipitación entre los dos.

### Factores que afectan la CEF.

a) pH.- El rango óptimo es de 8.2 - 8.8; si el pH es más bajo que el óptimo, la separación será mucho más lenta, o bien pueden aparecer los arcos de precipitación cerca del pozo del anticuerpo. Cuando el pH es mayor de 8.8, la reacción de precipitación es débil.

b) Molaridad.- Los amortiguadores más comúnmente usados son acetato de sodio-barbital o barbital-ácido dietil barbitúrico a una concentración de -- 0.032 - 0.050 mol/litro. En este rango la capacidad del amortiguador es buena y la fuerza iónica es baja. Bajo estas condiciones puede ser aplicado un voltaje alto, usando bajo amperaje que permite una rápida separación con buenos resultados sin excesivo calentamiento del medio. Un amortiguador de alta molaridad puede llevar más corriente o amperaje, produce más calor y separación en menos -- tiempo que en baja molaridad, pero el excesivo calentamiento puede secar el gel o romperlo.

c) Voltaje, amperaje y temperatura.- El voltaje óptimo va a depender del gel, molaridad del amortiguador, etc. Altas temperaturas pueden causar sequedad del gel y desnaturalización de los reactivos o aún causar que se funda el agar, con un consecuente derramamiento de la muestra en los pozos. Cuando ocurre ésto, puede haber una pérdida de sensibilidad de la reacción; sin embargo, las placas pueden ser lavadas con solución salina y teñidas, si así se desea, para observar mejor las líneas de precipitación. Usualmente se recomienda un voltaje que no exceda de 6 - 9 volt/cm., aunque un voltaje de 3 - 4 volt/cm., puede ser satisfactorio dependiendo de las demás condiciones.

d) Tiempo.- El tiempo va a depender de la distancia que hay entre los pozos con los reactivos y puede variar de 30 a 120 minutos. Parece que lo ideal es dejar correr la placa 1 hora, pues en menor tiempo puede reducirse un poco la sensibilidad

y las bandas de precipitación pueden ser un tanto difusas.

e) Agar.- La agarosa es el material más recomendado, ya que posee menos impurezas que el agar común o que el ión-agar; además, la agarosa pura es menos endosmótica. La clase y cantidad de impurezas pueden variar en agarosa de diferentes fuentes y - posiblemente en diferentes lotes de una misma fuente. También va a influir la concentración del - - agar, ya que de ella depende el tamaño de los poros que se forman en la matriz del gel. Muchos reactivos inmunológicos difunden libremente a través de los poros de agar de 0.3 a 1.5 por ciento, pero el agar al 2% tiene un tamaño de poro de aproximadamente 3  $\mu$ , lo cual no permitiría la difusión de partículas del tamaño del AgsHB.

f) Especímenes.- Para evitar que las muestras den reacciones dudosas, éstas deberán ser inactivadas por calentamiento a 56°C por 30 minutos o a 58°C por 6 minutos.

La hemólisis moderada en los sueros problema no produce interferencia en esta prueba, pero una contaminación microbiana puede reducir la sensibilidad del método.

## MATERIAL Y METODO.

### REACTIVOS:

- 1.- Solución amortiguadora de veronal para las placas, pH=8.6 fuerza iónica = 0.032 mol/litro. Pesar 13.38 g de 5,5 dietil-barbiturato de sodio; más 5.32 g de acetato de sodio anhidro.

Adicionar 0.2 g de timerosal como conservador, aforar a 1.5 lt con agua destilada. Ajustar el pH con HCl 0.12 moles/litro y luego aforar a 2-litros con agua destilada.

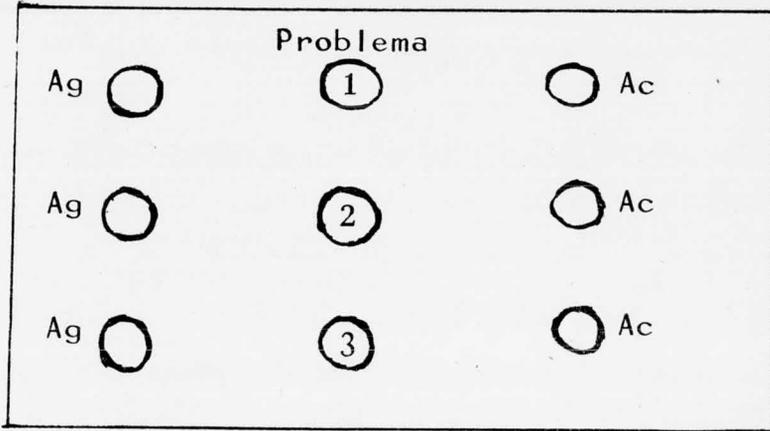
Esta solución amortiguadora puede guardarse a 4°C, por mucho tiempo.

## 2.- Preparación de las placas:

Las placas se preparan con agarosa, ya que tiene mayor pureza que el agar simple o el ión-agar, aunque puede ser sustituido por ellos; se prepara a una concentración del 0.7% en el amortiguador indicado anteriormente. La concentración de agarosa puede variar, pero para este propósito funciona bien a esa concentración; se funde la agarosa en autoclave para una completa homogeneidad, cuidando que no haya pérdida de volumen por evaporación. Se emplean placas rectangulares de tamaño adecuado a la cámara de electroforesis. A las placas utilizadas en este caso se les adiciona aproximadamente 22 ml. de la solución de agarosa 0.7%; se dejan solidificar perfectamente bien antes de usarse y se pueden guardar en el refrigerador pero teniendo cuidado de que no se sequen, para lo cual se envuelven en una bolsa de polietileno. Para ser usadas se les hacen tres hileras de pozos, ya que en el pozo central se colocará la muestra desconocida, en el pozo del lado del ánodo se pondrá el anticuerpo contra el AgsHB, mientras que en el pozo del lado del cátodo se colocará el AgsHB, como indica el diagrama siguiente:

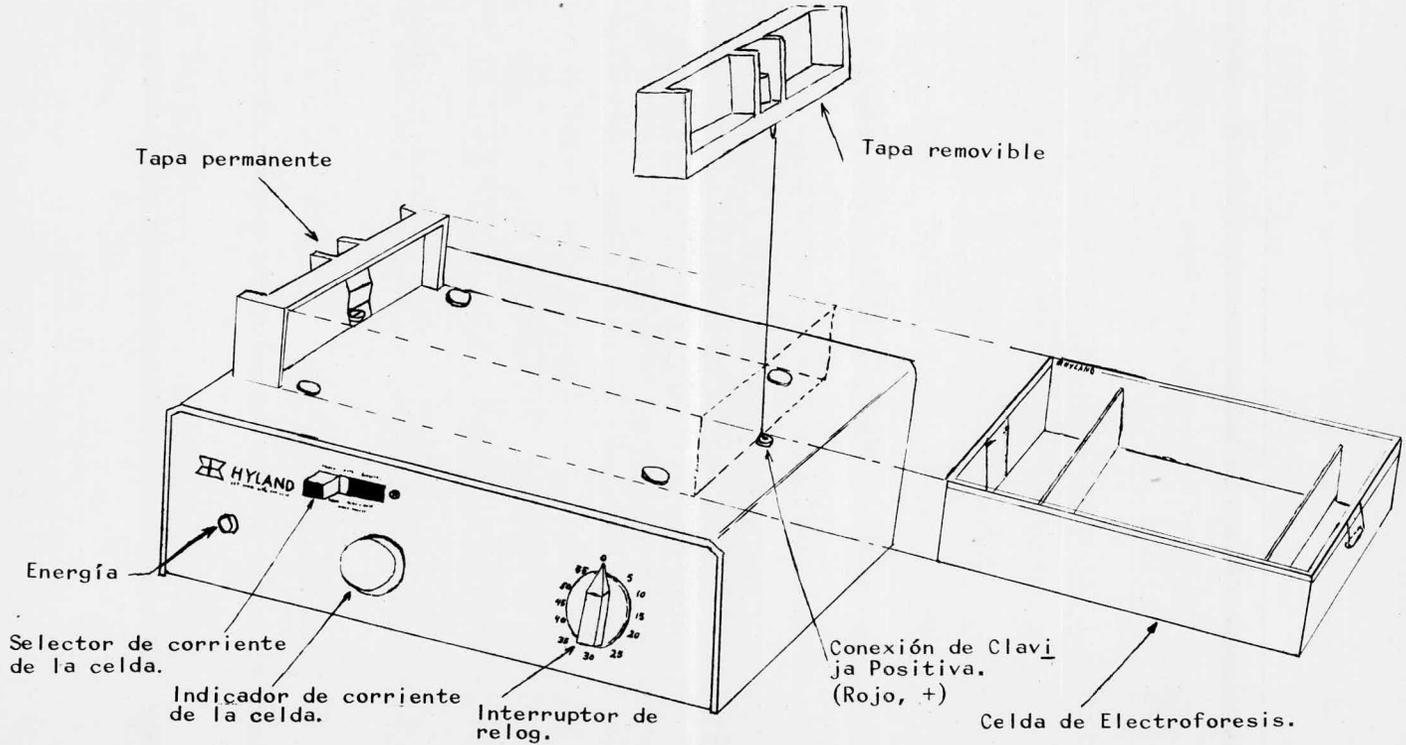
CATADO

ANODO

MATERIAL:

Se utilizó una fuente de poder marca Hyland; es una fuente de energía eléctrica con variaciones seleccionables de 30, 40 o 50 miliamperios. La -- fuente de energía proporciona condiciones óptimas para la ejecución de las pruebas electroforéticas sobre gel de agar (véase fig. No. 1).

FIGURA No. 1



Conexión de la celda de electroforesis a la fuente de Energía.

- 1.- Preparar los electrodos de hoja de estaño, de modo que una parte quede en la celda de electroforesis donde se va a poner la solución - - amortiguadora, y que además salga una porción de éste, que al doblarla (como se indica en la figura 2) asegure el contacto adecuado con las conexiones de la fuente de energía y elimine - la posible producción de un falso contacto en la unidad. Los electrodos de hoja no se deben extender más allá del fondo de la celda.
- 2.- Insertar en la tapa permanente el extremo de - la celda de la electroforesis que lleva la insignia de Hyland en la cubierta.
- 3.- Colocar la tapa removible en la conexión de - clavija y presionar hasta que quede en posición. La fuente de energía y la celda de la - electroforesis están ahora conectadas y listas para la contraelectroforesis.

Funcionamiento de la fuente de energía:

- 1.- Girar el interruptor del "Selector de corriente de la celda" al ajuste apropiado de la corriente de salida.
- 2.- Ajustar el interruptor automático de reloj girando la esfera en la dirección de las manecillas de un reloj al tiempo de funcionamiento - deseado, con lo cual se acciona automáticamente la fuente de energía (según lo muestra el - piloto del indicador energía y comienza el flu

jo de la corriente eléctrica a través de la celda de la electroforesis, según indica el piloto del "Indicador de corriente de la celda").

- 3.- El interruptor de reloj desconectará automáticamente la energía eléctrica al término del tiempo previamente determinado.

Para llevar a cabo la prueba de CEF se hicieron una serie de diluciones empleando solución salina isotónica; se hicieron diluciones 1:2, 1:4, - 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128 de los diferentes sueros que ya habían dado resultado positivo con la muestra sin diluir, con el fin de observar hasta qué dilución era posible observar las bandas de precipitación en los diferentes sueros y de este modo hacer una titulación relativa del AgsHB presente en cada suero.

Después de correr las diferentes diluciones se hizo un lavado de las placas con solución salina, y una intensificación para lograr la mejor observación de las bandas de precipitación; la intensificación se hace empleando solución de ácido tánico al 1%, recientemente preparada, de la cual se adicionan unos 10 ml. sobre la placa ya corrida y luego se escurre la solución sobrante y se lava (63)

Aunque este tratamiento no aumentó la sensibilidad de la técnica, fué muy útil para definir las bandas cuando eran dudosas, y para evitar resultados falsos positivos debidos a la formación de alguna banda inespecífica.

Para intensificar las bandas de precipitación, y así evitar dar un resultado falso negativo; se tratan las placas ya corridas con solución de ácido tánico al 1% recién preparado, adicionar 10-ml. de esta solución sobre cada placa, luego tirar el sobrenadante y lavar la placa con solución salina (63).

## PRUEBA DE HEMAGLUTINACION REVERSA PASIVA PARA LA - DETECCION DEL "AgsHB".

### GENERALIDADES:

Esta técnica se basa en que los anticuerpos- (globulinas) cubren fácilmente la superficie de -- los eritrocitos que han sido tratados con ácido tá nico (63). Los anticuerpos altamente purificados- y aislados de sueros anti específicos contra el -- AgsHB, pueden ser unidos a eritrocitos de pavo pre viamente tanizados y producir una suspensión de -- eritrocitos sensibilizados que serán aglutinados - en presencia del AgsHB. Una pequeña proporción de sueros humanos normales puede reaccionar contra -- las proteínas del suero de caballo o contra los - eritrocitos del pavo, dando una aglutinación no es pecífica con las células sensibilizadas, pero esas reacciones no específicas pueden ser detectadas -- por medio de un "control", usando células cubier-- tas con inmunoglobulinas normales de caballo, para así tener un control tanto de las células de pavo- como de las proteínas del suero de caballo.

Tanto las células de control como las de - - prueba pueden ser tratadas con formaldehido y lio- filizadas para darles mayor estabilidad durante su almacenaje.

La prueba de hemaglutinación reversa pasiva- constituye uno de los estudios serológicos más sen sibles, quizá no tanto como el de RIA, (64) pero - si más sensible que otros métodos comúnmente usa-- dos en los laboratorios; se ha observado que es -

aún más sensible que el método de fijación de complemento, y no existe el riesgo de dar resultados falsos positivos o viceversa, si se usan los controles adecuados.

En este trabajo se utilizó un equipo "Hepa--test" donado por los laboratorios Wellcome Reagents Limited y enviado directamente al Hospital del Niño DIF (antes IMAN). Debido a que este material no está disponible comercialmente en México, a continuación se indican sus características con todo detalle:

### MATERIAL DE LABORATORIO:

#### A).- EQUIPO DE MICROTITULACION

- 1).- Placas de microtitulación con fondo en "U", - de 96 cavidades, 12 a lo largo y 8 a lo ancho; cada cavidad tiene una capacidad de 12 gotas de 0.025 ml. o sea 0.3 ml.
- 2).- Micropipetas calibradas que tienen una capacidad de 5 ml. y el volumen de la gota es de -- 0.025 ml.
- 3).- Microdilutores calibrados.- Los microdiluto-- res deben tener una capacidad de 0.025 ml.

#### PREPARACION DEL MATERIAL PARA LA PRUEBA:

##### LAVADO DE LAS PLACAS:

Las placas nuevas se dejan de 18 a 24 horas en agua con 1% de detergente 7X (que es un deter-- gente atóxico para las células, muy usado en el la

boratorio). Sacarlas y enjuagarlas muy bien con agua de la llave y en seguida con agua destilada - unas 5 veces; sacudir y proceder a limpiar con hisopo de algodón, cavidad por cavidad.

Una vez usadas las placas, manejarlas con mucho cuidado ya que son potencialmente peligrosas - debido a la presencia del AgsHB, por lo cual se -- procede a colocarlas en una solución de formol al 10% durante unas 24 horas como mínimo; al cabo de ese tiempo enjuagarlas y pasarlas a una solución - al 1% de detergente 7X y seguir con el lavado normal.

#### LAVADO DE LAS MICROPIPETAS:

Las micropipetas se lavan de la misma manera que se lavaron las placas nuevas, sólo que después de enjuagar con agua destilada se dejan escurrir - en un vaso de precipitados (con una gasa o algodón al fondo) hasta que sequen, o bien pueden secarse con aire a presión o con vacío.

Si las micropipetas han sido usadas, sobretodo si se empleó material contaminado, se procederá a esterilizar en autoclave a 121°C o 15 libras de presión durante unos 20 minutos como mínimo; si no se tiene a mano la autoclave se dejarán cuando menos 24 horas en solución de formol al 10%, y después se procederá al lavado común.

#### ESTERILIZACION DE LOS MICRODILUTORES:

La mejor forma de esterilizar los microdilutores es a la flama del mechero (deben llevarse en

la flama al rojo vivo), operación que debe hacerse cada vez que se use un microdilutor; cuando el microdilutor ha sido usado y contiene suero problema se deberá lavar en solución de hipoclorito de sodio al 10%, y luego dos veces en agua destilada antes de flamearlos al rojo vivo, para evitar que vaya a salpicar la muestra contaminada.

### REACTIVOS:

#### a) ERITROCITOS DE PRUEBA.

Cada frasco de eritrocitos de prueba contiene el liofilizado equivalente a 1 ml. o a 5 ml. de una suspensión al 1% de eritrocitos de pavo formalinizados y tanizados, cubiertos con anticuerpos - purificados contra el AgsHB, preparados en caballo; los eritrocitos así preparados se suspenden en un amortiguador salino de fosfatos (pH 7.2 0.15 M) - conteniendo 5 % de sacarosa, 1.5 % de suero normal de conejo y 0.1 % de azida de sodio.

#### b) ERITROCITOS DE CONTROL.

Cada frasco de eritrocitos de control contiene el equivalente a 1 ml. o a 5 ml. de una suspensión al 1 % de eritrocitos de pavo formalinizados y tanizados cubiertos con globulina normal de caballo, suspendidos en un amortiguador salino de fosfatos (pH 7.2, 0.15 M) conteniendo 5 % de sacarosa, 1.5 % de suero normal de conejo y 0.1% de azida de sodio.

## c) AMORTIGUADOR DILUYENTE.

Cada frasco contiene 30 ml. o 75 ml. de amortiguador salino de fosfatos 0.15 M y pH 7.2 conteniendo suero normal de caballo, suero humano normal, y 0.1 % de azida de sodio, todo estéril. El volumen de suero humano normal adicionado es ajustado para dar resultados óptimos con cada lote de células sensibilizadas.

## d) CONTROL POSITIVO.

Cada frasco contiene 1.0 ml. de suero humano normal diluido, inactivado por calentamiento. Cuando se prueba a una dilución 1:8, el control positivo debe dar un patrón claro de aglutinación con las células de prueba. En una titulación completa, el punto final no será menor de 1:32 contra las células de prueba, mientras que con las células de control no deberá mostrar aglutinación en ninguna dilución.

Resultados discordantes en los controles indican deterioro ya sea de los eritrocitos de control o de los de prueba, o contaminación del amortiguador diluyente.

## e) CONTROL NEGATIVO.

Cada frasco contiene 1.0 ml. de suero humano normal. Cuando se efectúa la prueba de escrutinio o la prueba confirmatoria, no deberá observarse ninguna aglutinación tanto con las células de prueba como con las de control.

Fallas en esta reacción serán indicio de deterioro de las células o de contaminación del buffer diluyente.

#### RECONSTITUCION DE LOS REACTIVOS.

El material celular deberá ser reconstituído con agua destilada hasta el volumen marcado en el frasco. Para ejecución óptima de la prueba, las células deberán rehidratarse unos 15 minutos antes de ser usadas.

#### ALMACENAMIENTO Y PERIODO DE ACTIVIDAD

Antes de ser reconstituídos, los reactivos pueden ser conservados a 4°C. para retener su potencia cuando menos hasta la fecha indicada en el marbete (un año después de la última prueba hecha por Wellcome).

Una vez reconstituídos, la suspensión de células puede permanecer estable a 4°C durante el resto del día de prueba. Para almacenarse por tiempo más prolongado (un mes) la suspensión de células puede ser congelada alrededor de -20°C y des congelarse sólo una vez; (para aprovechar al máximo estos materiales, se distribuían ambas suspensiones recién preparadas en pequeñas alícuotas de 0.6 ml. y se congelan a -20°C aproximadamente, de manera que para cada 24 pozos se descongelaba una alícuota que era utilizada en seguida).

El amortiguador diluyente y los controles pueden ser guardados a 4°C por mucho tiempo, siempre y cuando se evite su contaminación, para lo -

cual se pueden dividir también en alícuotas, todo en forma estéril.

## M E T O D O.

### PRUEBA DE ESCRUTINIO:

- 1.- Con una micropipeta calibrada de 0.025 ml., poner 3 gotas de amortiguador diluyente en el primer pozo y una gota en el segundo de cada hilera vertical de la placa.
- 2.- Tomar 0.025 ml. de suero con un microdilutor y mezclar con el diluyente del primer pozo para tener una dilución 1:4. Transferir el microdilutor al segundo pozo para tener una dilución de prueba 1:8. Repetir la operación para todos los sueros problema que serán probados en la placa. Enjuagar los dilutores en solución de hipoclorito al 10% (o formol al 10%) dos veces en agua destilada, y flamearlos después de cada uso.
- 3.- A cada una de las diluciones 1:8 adicionar una gota (0.025 ml.) de las células de prueba (mezclar el frasco de la suspensión inmediatamente antes de pipetear).
- 4.- Mezclar el contenido de los pozos por agitación cuidadosa de las placas.
- 5.- Cubrir las placas con parafilm (o similar) y dejar en reposo a temperatura ambiente.
- 6.- Leer los resultados después de media a 1 hora.

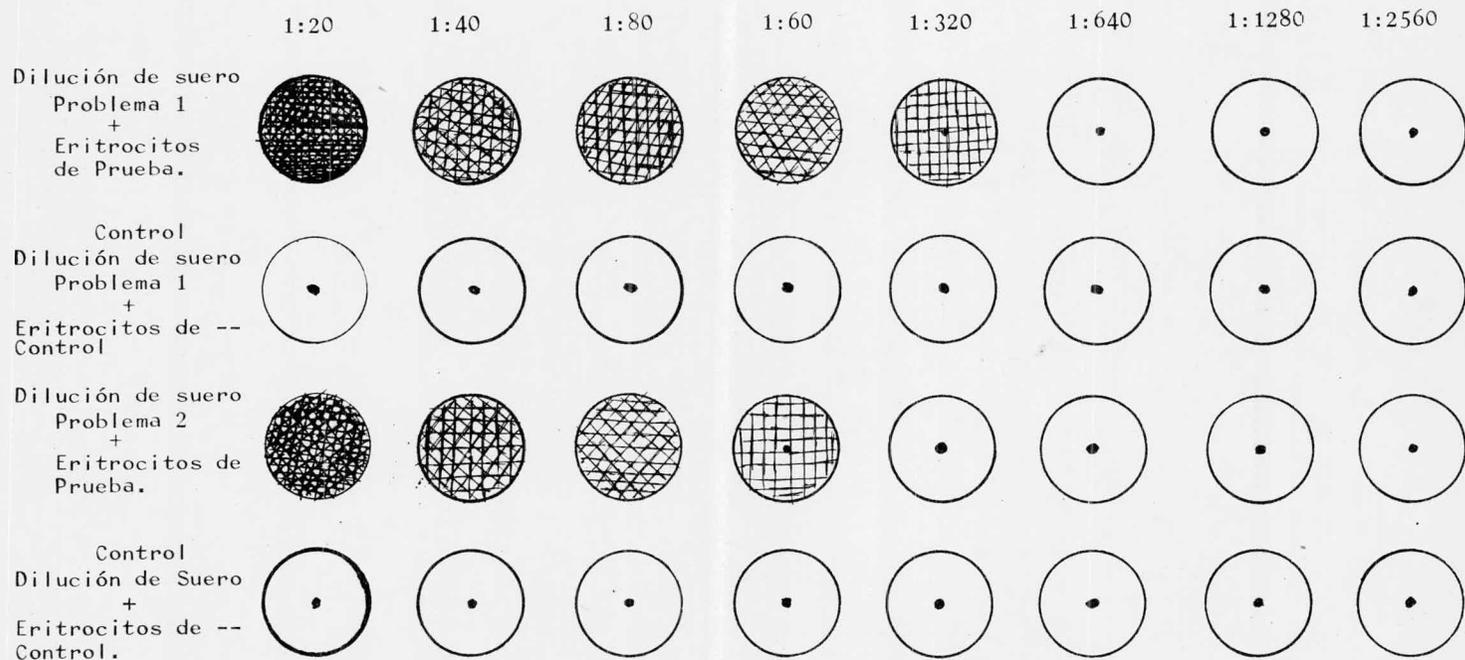
## RESULTADOS:

Los resultados son leídos comparando el patrón de sedimentación de las células agregadas a las muestras en prueba con el de las células agregadas al control positivo y al control negativo.

En una reacción positiva las células pueden estar parcial o totalmente aglutinadas formando una, capa uniforme en el fondo de los pozos (Fig. 3).

Cuando la prueba es negativa las células se depositan en el fondo de la placa en "U" y entonces forman un anillo o "botón" en el centro del pozo (Fig. 3).

Interpretación de la Titulación de Ags HB





## INTERPRETACION:

Los resultados positivos deben ser confirmados por pruebas posteriores siempre que sea posible. Muchas pruebas de escrutinio positivas son debidas a la presencia ya sea del AgsHB o a reactividad no específica anti-células de pavo. De esta manera puede obtenerse la confirmación preliminar y la cuantificación titulando las muestras de sueros sospechosos contra eritrocitos de prueba y de control.

## PRUEBA CONFIRMATORIA:

Es conveniente llevar a cabo la prueba confirmatoria en dos fases, de las cuales la primera puede realizarse con reactivos suministrados en el kit.

### FASE 1.

- 1.- Poner una gota de diluyente (0.025 ml.) en cada pozo de dos filas en una placa (fila de prueba y de control).
- 2.- Tomar 0.025 ml. de suero problema con cada uno de dos microdilutores y mezclar con el diluyente en cada uno de los dos primeros pozos; se mezclan bien con el diluyente para tener en el primer pozo una dilución 1:2. Transferir los dilutores a los segundos pozos de cada fila para tener diluciones 1:4, y se sigue haciendo lo mismo en cada pozo de dos filas hasta tener diluciones desde 1:2 hasta 1:512.

- 3.- Agregar 0.025 ml. de células de prueba a cada pozo en la fila de prueba, comenzando con la dilución 1:4.
- 4.- Agregar 0.025 ml. de células de control a cada pozo en la fila de control, empezando por la dilución 1:4.
- 5.- Mezclar las placas, cubrir, dejarlas en reposo de 1/2 a 1 hora a temperatura ambiente y leer los resultados como en la prueba de escrutinio.

#### RESULTADOS:

Se toma como punto final, la dilución más alta, que muestra aglutinación definida.

#### INTERPRETACION:

Un resultado positivo provisional está indicado por la presencia de un título mayor en la fila de prueba (al menos cuatro veces mayor) que en la fila de control. Una aglutinación en el primer pozo (1:4) de la fila de prueba sólo es sugestiva de reacción positiva débil en el límite de sensibilidad del sistema. Si se observa aglutinación a la misma dilución en ambas filas de prueba y de control, indica que la prueba de escrutinio fué positiva debido a aglutinación no específica. Aunque la muestra de suero es probablemente negativa para el AgsHB, existe la posibilidad de que la aglutinación inespecífica enmarcare una reacción débilmente positiva.

## FASE 2:

La confirmación final de los resultados positivos en la prueba de escrutinio debería obtenerse por el sistema de hemaglutinación o por métodos alternativos de igual o mayor sensibilidad, tales como RIA.

Como una prueba de escrutinio el sistema Hepatest es ligeramente menos sensible que el radioinmunoanálisis, pero considerablemente más sensible que el método de inmunodifusión en gel de agar es más sensible también que la contraimmunoelectroforesis y que la fijación de complemento.

No se ven prozonas con muestras de título alto y por eso no es necesario probar a más de una dilución, a menos que se quiera cuantificar. El patrón de células aglutinadas en sueros fuertemente positivos puede colapsarse ligeramente y dar anillo periférico fino si se deja más de una hora.

La incidencia relativa de positivas verdaderas y positivas en la prueba de escrutinio varía dependiendo de la población estudiada y de las buenas condiciones de las muestras.

## METODO DE FIJACION DE COMPLEMENTO

### GENERALIDADES:

La prueba de fijación de complemento (FC) es una prueba serológica para la detección de antígeno y anticuerpos en presencia de complemento usando un sistema indicador hemolítico.

El complemento es preparado a partir de suero fresco normal de cuy. La combinación de Ag y - Ac específicos unen o "fijan" el complemento. Si no hay antígeno presente para que se combine con el anticuerpo, el complemento permanece libre. Entonces la presencia o ausencia de complemento libre se investiga con un sistema indicador para ver si se ha utilizado el C' éste está formado por eritrocitos de carnero y su anticuerpo específico, preparado en conejos. Este anticuerpo contra eritrocitos de carnero se llama "hemolisina" o amboceptor y los eritrocitos cubiertos con ésta, se dice que están "sensibilizados". El complemento libre que no ha sido fijado a un complejo Ag-Ac lisa a los eritrocitos sensibilizados. Al probar diluciones seriadas de la muestra problema, la presencia de hemólisis en los tubos de reacción indica la cantidad de antígeno o anticuerpos.

La prueba de fijación de complemento para -- AgsHB fué descrita al mismo tiempo por Shulman -- (65) y por Purcell (66).

La prueba es un sistema altamente sensible y es útil para indicar AgsHB y/o Ac, cuando se usa un sistema de control apropiado, que incluye con--

troles para el sistema de eritrocitos, el complemento, el suero problema y el Ag.

### MATERIAL Y METODO:

El material de laboratorio para llevar a cabo la prueba de FC, usando como variante una microtécnica, fué el mismo que se empleó en el método de hemaglutinación directa, según se describe posteriormente.

A).- Equipo de microtitulación.

B).- Material de uso común en laboratorio.

C).- Reactivos:

- 1.- Solución diluyente para la prueba, denominada GVB, o sea solución amortiguadora de veronal y gelatina preparado como se indica en (67) y (68).
- 2.- Eritrocitos de carnero.- Obtenidos de sangre de carnero en solución de Alsever (en proporción de 1:5) y dejados a 4°C por una hora. Se lavan las células en GVB por 10 minutos a 1500 rpm, en centrifuga refrigerada, por tres veces; luego se hace una suspensión de eritrocitos al 2% en GVB, verificando la concentración con un hematocrito y ajustando si es necesario. Otro método de ajustar los eritrocitos es empleando un espectrofotómetro como se indica en (69).  
El lavado de las células se debe hacer después de 4 a 5 días de que se sangró al animal, y no se deberán usar dos semanas después de la fecha de sangrado.
- 3.- Hemolisina.- La hemolisina o amboceptor es pre

parada en conejo; es un suero anti-eritrocitos de carnero, se prepara y titula como se indicó en (70).

4.- Complemento de cuy.- Se obtiene del suero fresco de cuy, el cual debe mantenerse en congelación, ya que es una sustancia termolabil. Se toma una alícuota para titularlo, y se mantiene el resto congelado a  $-60^{\circ}\text{C}$ . La titulación se lleva a cabo como se indica en (71).

5.- Anticuerpos contra el virus de hepatitis "B" - ( $\text{Ac}_s\text{HB}$ ).

Pueden ser obtenidos por plasmoféresis de un paciente hemofílico politransfundido que contenga los anticuerpos.

El suero anti también puede ser preparado en el laboratorio, solo que se necesita un antígeno HB purificado para evitar la formación de anticuerpos inespecíficos, que requerirían una absorción y darían por resultado la formación de complejos inespecíficos que pueden fijar el complemento, y así dar reacciones inespecíficas llamadas anticomplementarias.

Existen varios procedimientos para eliminar esta actividad anticomplementaria, que daría reacciones falsas positivas; uno de ellos es el tratamiento previo del suero anticomplementario con un exceso de complemento (71), lo cual se hace con el fin de que si existen complejos inespecíficos éstos fijen el complemento que se adiciona inicialmente, y así no exista alteración posterior durante la ejecución de la prueba.

6.- Suero control positivo.

7.- Suero control negativo.

### PROCEDIMIENTO:

El procedimiento utilizado fue el indicado - en la bibliografía (71); aquí no se hará mención - de todos los pasos ya que sería demasiado extenso. Solo vale la pena hacer resaltar que para la ejecu - ción de esta prueba es de vital importancia tener - bien titulados todos los reactivos, desde el com - plemento utilizado a 2 U, la hemolisina que tam - bién se deberá titular y utilizar una dilución a 2 U; los eritrocitos deberán estar bien ajustados al 2 %. Si se va a determinar y cuantificar la pre - sencia del AgsHB, deberá tenerse un suero con Ac - (anticuerpos) específicos bien titulado y emplean - do también dilución a 2 U, o bien tener un antíge - no específico titulado si se van a determinar anti - cuerpos, para tener la seguridad de que la prueba - se lleva a cabo en las condiciones óptimas se debe - rá correr una serie de controles, que deberán dar - resultados satisfactorios, como se ve en el cuadro siguiente:

CUADRO DE CONTROLES QUE SE DEBEN DE  
CORRER EN "FC":

RESULTA -  
DOS

- |   |          |
|---|----------|
| 1.- Suero Problema: GVB+Ag + Ac + C' + E.S -- | no lisis |
| Control del suero GVBAg+ -- + C' + E.S --     | lisis    |
| 2.- Suero positivo GVB+Ag + Ac + C' + E.S --  | no lisis |
| Control del suero GBV+Ag+ -- + C' + E.S --    | lisis    |

- 3.- Suero negativo GBV+ -- + Ac + C' + E.S -- lisis  
 Control del suero GBV+ - + -- + C' + E.S -- lisis
- 4.- Control Complemento GBV+ -- + C' + E.S -- lisis
- 5.- Control eritrocitos GBV+ -- + -- + E.S -- no lisis

Cada suero problema se corre por duplicado, - ya que uno sirve para buscar el posible antígeno, - mientras que el otro sirve para probar que no hay actividad anticomplementaria, para lo cual se le agrega a este control complemento y eritrocitos -- sensibilizados, para ver que no fija el complemento, estos controles deberán dar lisis, si no se deberán tratar los sueros como se indica en (69); todas las diluciones se hacen con GVB, ya que contiene iones  $Mg^{++}$  y  $Ca^{++}$  necesarios para llevar a cabo la reacción de fijación de complemento.

Nota: Claves usadas en el cuadro de controles.

GVB = Solución amortiguadora usada como diluyente en esta prueba.

Ac = Anticuerpos específicos contra el antígeno.

C' = Complemento standarizado a 2 U.

E.S = Eritrocitos de carnero sensibilizados - con su hemolisina.

Ag = Antígeno presente en los sueros positivos.

## METODO DE RADIOINMUNOANALISIS (RIA).

La técnica de RIA es la más sensible y específica disponible hasta el momento para la detección del AgsHB. Las mayores desventajas son el tiempo para completar la prueba, el costo y la necesidad de manejar radioisótopos, con sus riesgos asociados.

Cuatro métodos básicos de RIA han sido descritos para la detección del AgsHB (también pueden ser detectados los anticuerpos respectivos) las técnicas son: De doble anticuerpo (72, 73, 74), un método de fase sólida (73), un método de cromatografía electroforesis (75), y el procedimiento de una fase sólida directa "Sandwich" (76). Estos difieren primeramente en el método usado para la detección del complejo antígeno-anticuerpo y en el lugar demarcado por la radioactividad ejem: ya sea sobre el Ac HB purificado o sobre el Ag HB purificado. La pureza de la porción marcada es un componente esencial para la especificidad de la prueba. Los métodos más comúnmente usados incluyen la fase sólida o sea la técnica de Sandwich RIA y el procedimiento de doble-anticuerpo (RIA-DA).

### "RIA" METODO UTILIZADO: METODO DE SANDWICH.

Para llevar a cabo este método el Servicio de Medicina Nuclear del DIF (antes IMAN), proporcionó un equipo de los laboratorios Abbott, denominado: AUSRIA II-125, Hepatitis Associated Antibody (anti-Australia Antigen) 125 I Human.

Este equipo se basa en el método de fase só-

lida o "sandwich" en el que se emplea una fase sólida que contiene anticuerpos contra el AgsHB; se pone a reaccionar esta fase con el suero problema en el cual se cree está presente el AgsHB, y por último se pone este complejo en contacto con anticuerpos contra el AgsHB marcando con  $^{125}$  radiactivo para así formar el sandwich. Finalmente, se cuantifica la radioactividad fijada a la fase sólida.

La prueba se realizó de acuerdo a las indicaciones que se encuentran en el instructivo de la casa fabricante.

#### MATERIALES:

- 1.- Control negativo (plasma humano recalificado que no contiene AgsHB). Conservador: 0.1% de azida de sodio. Manéjese como capaz de transmitir la hepatitis.
- 2.- Control positivo (plasma humano con AgsHB). Para ajustar la potencia se usa como diluyente una solución amortiguadora de TRIS 0.01 mol/litro conteniendo 4% de albúmina bovina. Conservador 0.1% de azida sódica. Manéjese como capaz de transmitir la hepatitis, aun cuando ha sido calentado a 60°C por 10 horas.
- 3.- Anticuerpo (Anti-AgsHB)  $^{125}$ I (humano). Para ajustar su potencia se usa como diluyente una solución amortiguadora de TRIS 0.005 mol/litro conteniendo 50% de suero de ternera, 2% de suero humano normal y 0.05% de albúmina bovina. Conservador 0.1% de azida de sodio. Manéjese-

como capaz de transmitir la hepatitis.

- 4.- Anticuerpo anti AgsHB (cuy). Perlas de polietileno cubiertas con Ac<sub>S</sub>HB preparado en cuy. - Manéjese como capaz de transmitir la hepatitis.

Material adicional:

- 1.- Pipetas de precisión para medir 0.2 ml.
- 2.- Jeringas Cornwall o similar, para emplearse durante los lavados.
- 3.- Un aspirador para eliminar la solución de lavado, por ejem. un Uniwash<sup>TM</sup> 11, con una fuente de vacío y una trampa para retener la solución.
- 4.- Un detector de centelleo gamma, de pozo.
- 5.- Un baño de agua a  $45^{\circ}\text{C} \pm 1$

Procedimiento de prueba "A" (Incubación: 2 horas a  $45^{\circ}\text{C}$ ; luego 1 hora a  $45^{\circ}\text{C}$ .)

- 1.- Ajustar la temperatura del baño a  $45^{\circ}\text{C}$ .
- 2.- Destapar el tubo de plástico que contiene las cuentas de polietileno cubiertas con el suero anti AgsHB, y colocar una cuenta en cada pozo o fondo del tubo de reacción. Se hacen por duplicado, y se corren a la vez 7 controles negativos y 3 controles positivos.
- 3.- Usando pipetas de precisión, adicionar 0.2 ml. de suero (o plasma recalificado) y los controles positivos y negativos en el fondo de los tubos respectivos. Cuidando que cada muestra de prueba quede rodeando a la cuenta cubierta-

de suero anti AgsHB. Tapar el tubo de reacción, y evitar que queden burbujas de aire entre el suero y la perla de reacción.

- 4.- Los tubos ya tapados se ponen a incubar en baño de agua a  $45^{\circ}\text{C}$  por dos horas.
- 5.- Al final de las dos horas, sacar los tubos del baño de agua. Quitar la cubierta y descartarla. Usando un aspirador semi-automático, aspirar el suero que no reaccionó, y lavar las perlas de reacción con 5 ml. de agua destilada o deionizada. Repetir el procedimiento de lavado una vez más. Teniendo cuidado de no dejar ningún residuo de líquido.
- 6.- Con pipeta de precisión, adicionar 0.2 ml. de anticuerpo asociado a la hepatitis marcado con Iodo 125 (humano) en el fondo de cada tubo de reacción, cuidando de que el antisuero cubra perfectamente la perla de reacción y de que no se formen burbujas de aire.
- 7.- Aplicar una nueva cubierta a los tubos, e incubarlos en un baño de agua a  $45^{\circ}\text{C}$  por una hora.
- 8.- Al final de esa hora sacar los tubos del baño de agua, quitar la cubierta, aspirar el antisuero y lavar la perla de reacción con dos porciones de 5 ml. de agua destilada o deionizada como en el paso 5.
- 9.- Transferir las perlas de los tubos de reacción a tubos del contador, teniendo cuidado de marcarlos perfectamente bien.
- 10.- Poner los tubos en un contador gamma para obtener

ner el número de cuantas. La posición de las perlas en el fondo de los tubos no es crítica. Aunque tampoco lo es hacer la cuenta inmediatamente, debe realizarse tan pronto como sea posible. Todas las muestras de control y las desconocidas se deben leer simultáneamente.

### RESULTADOS:

La presencia o ausencia de antígeno de la Hepatitis B, está determinado por la relación de -- cuentas netas por minuto de una muestra desconocida y de cuentas netas por minuto de la media de -- control negativo multiplicada por el factor 2.1.

Las muestras desconocidas cuyas cuentas netas son más altas que el valor medio establecido -- con los controles negativos, deberá ser considerado positivo con respecto al antígeno de la Hepatitis B.

El valor medio para las muestras de control -- positivo debe ser al menos 5 veces la media del -- control negativo. De no ser así, puede sospecharse de error técnico y debe repetirse la serie.

### CALCULOS:

1.- Cálculo de la media de controles negativos.

Se suman las cuentas por minuto obtenidas para cada muestra control negativa y el total se divide entre el número de muestras sumadas (en -- este caso se corrieron 7 controles negativos).

Ejem:  $\frac{\text{Total neto de cpm}}{7} = \frac{2705}{7} = 386 \text{ cpm (media)}$

Se descartarán los valores de controles negativos que se salgan de los límites 0.5 a 1.5 veces la media. Ejemplo:

$$0.5 \times 386 = 193 \quad \text{y} \quad 1.5 \times 386 = 579$$

Los límites serán: 193 cpm a 579 cpm.

2.- Para calcular el valor tope (cutoff).

Se multiplica la media de los controles negativos, 386 cpm por el factor 2.1.

Así el valor tope calculado es de 811 cpm.

Las muestras desconocidas cuyas cuentas netas sean más altas que el valor-tope calculado deberán ser consideradas positivas con respecto al antígeno HB.

Nota: Cuando el contador gamma no sustrae automáticamente el valor del fondo, la sustracción se hará manual para cada muestra, y la cuenta por minuto de muestra sin corregir puede ser comparada con un valor tope modificado como sigue: (media de control negativo - fondo) X 2.1 + fondo = valor-tope modificado.

Ejem: Fondo del aparato = 50 cpm.

$$\text{Valor-tope modificado} = (436 - 50) \times 2.1 + 50 = 861 \text{ cpm.}$$

3.- Cálculo de la relación entre control positivo y control negativo = P/N

Se divide la media de controles positivos en--

tre la media de controles negativos después de corregirlos por el fondo.

$$\text{Relación P/N} = \frac{\text{Media neta de controles positivos}}{\text{Media neta de controles negativos}}$$

Este promedio debe ser al menos 5, o la prueba deberá repetirse.

Ejem: Valor medio neto de controles positivos  
= 5906 cpm

Valor medio neto de controles negativos  
= 386 cpm

$$\text{Relación P/N} = \frac{5906}{386} = 15.3$$

En este caso la prueba es válida.

## CAPITULO VIII

RESULTADOS Y DISCUSION.

La detección del AgsHB se ha convertido en una prueba rutinaria en los laboratorios de virología y en los bancos de sangre, por su utilidad diagnóstica en los padecimientos hepáticos y por la importancia de evitar las hepatitis postransfusionales. La metodología respectiva ha evolucionado con rapidez a partir del descubrimiento del AgsHB por Blumberg, como ya se indicó anteriormente, y existen en la actualidad cuando menos dos métodos de sensibilidad comparable como son el RIA y la hemaglutinación reversa pasiva. Otros métodos de sensibilidad absoluta más baja siguen teniendo vigencia por poseer características favorables de orden práctico y económico y porque su sensibilidad relativa no resulta demasiado baja respecto de los otros antes mencionados. Existen reportes de sueros negativos por RIA que dan reacción positiva con métodos considerados como poco sensibles como ID y CEF, lo cual se ha interpretado como un fenómeno relacionado con especificidad y no con sensibilidad, y nos obliga a tomar con ciertas reservas la característica "sensibilidad" como factor decisivo en la selección de metodología.

La posibilidad de probar una serie de sueros por varios métodos en el laboratorio de virología del hospital del niño DIF (antes IMAN) ha constituido una oportunidad muy particular para obtener información útil tanto para evaluar la sensibili-

dad de los métodos estudiados como para determinar el subtipo de algunos de ellos, lo cual se hace -- por primera vez en nuestro país. En el transcurso de este trabajo se hicieron también pruebas de CEF, para AgsHB y AcsHB a varios grupos de muestras de sueros, según se detallará más adelante.

Como puede verse en el cuadro No. 7, de diecinueve sueros probados por CEF; HARP y RIA, tres negativos por los dos primeros métodos resultaron positivos por RIA, de ellos un positivo débil -- (6627) y otro francamente dudoso (4467). Debe tomarse en cuenta que el método de RIA puede dar lugar a falsas positivas, sobre todo a niveles muy bajos de sensibilidad, por lo cual la casa fabricante considera indispensable que todas las muestras positivas se repitan para confirmación, elevándose así el costo de la prueba que es uno de sus dos inconvenientes principales. Puede considerarse por lo tanto que la correlación entre CEF y HD fué completa (total), y que la correlación entre estos dos métodos y RIA fué bastante satisfactoria.

Algunas muestras que aparecen en el cuadro No. 8, fueron probadas únicamente por CEF y RIA -- por no contar con cantidad suficiente para otras pruebas; puede verse una correlación muy satisfactoria en los resultados negativos, excepto en el 4430, 4467, y 6627 que fueron negativos por CEF y positivos por RIA, uno débilmente positivo y otro muy débilmente positivo que se interpretó como dudoso porque no fué posible repetirlo. Durante el lapso de tiempo en que se practicaron estas prue--

## CUADRO No. 7

SUEROS PROBADOS POR C.E.F.: HARP : R.I.A.

	C.E.F.	HARP	R.I.A.
D.R.	1:32	1:1280	+
M.V.	1:16	1: 320	+
1471	1:16	1: 320	+
1602	1:16	1: 320	+
2480	1:16	1: 320	+
3129	1:16	1: 320	+
4176	1:16	1: 640	+
4430	Neg.	Neg.	+
4467	Neg.	Neg.	+ Dudoso
4527	1:16	1: 640	+
4612	1:16	1: 320	+
4626	1:16	1: 320	+
4642	1:16	1: 320	+
5322	1:16	1: 640	+
5778	1: 4	1: 160	+
5875	1:32	1: 640	+
6627	Neg.	Nég.	+ Débil
7352	1:32	1: 640	+
9067	1:16	1: 320	+

## CUADRO No. 8

## SUEROS PROBADOS POR CEF. y RIA.

	CEF.	RIA.		CEF.	RIA.
1) 1471	( + )	( + )	22) 9067	( + )	( + )
2) 1602	( + )	( + )	23) A.A.	( - )	( - )
3) 1877	( - )	( - )	24) B.P.	( - )	( - )
4) 2480	( + )	( + )	25) C.J.I.	( - )	( - )
5) 3129	( + )	( + )	26) C.M.	( - )	( - )
6) 3938	( - )	( - )	27) D.R.	( + )	( + )
7) 4176	( + )	( + )	28) H.H.P.	( - )	( - )
8) 4430	( - )	( + )	29) J.A.M.	( - )	( - )
9) 4432	( - )	( - )	30) J.E.	( - )	( - )
10) 4456	( - )	( - )	31) L.M.	( - )	( - )
11) 4467	( - )	( + )	32) L.R.I.	( - )	( - )
12) 4485	( - )	( - )	33) M.R.E.	( - )	( - )
13) 4489	( - )	( - )	34) M.A.S.	( - )	( - )
14) 4527	( + )	( + )	35) M.P.G.	( - )	( - )
15) 4534	( - )	( - )	36) M.V.	( + )	( + )
16) 4562	( - )	( - )	37) O.G.M.	( - )	( - )
17) 5322	( + )	( + )	38) P.S.M.	( - )	( - )
18) 5778	( + )	( + )	39) R.A.M.	( - )	( - )
19) 5875	( + )	( + )	40) R.A.S.	( - )	( - )
20) 6627	( - )	( + )	41) V.D.	( - )	( - )
21) 7352	( + )	( + )	42) V.R.D.	( - )	( - )

dudo  
sodé-  
bil

bas comparativas de sensibilidad, se probaron también muchos sueros que resultaron negativos tanto por CEF como por HD, y 4 sueros de personal que -- trabaja en la unidad de diálisis en el hospital, -- los que también resultaron negativos por ambos métodos.

Otra serie de muestras (27 en total) todas -- positivas por HARP y por CEF, fueron tipificadas y se encontraron los resultados que aparecen en el -- cuadro No. 10. Llama la atención la elevada prevalencia del tipo Ad (20 de 27), que en siete muest-- tras se encontró al parecer combinado con tipo Ay-- y, solamente en un caso (9836) este último produjo una reacción más intensa que el Ad. Al subtipo -- Adr correspondieron cinco muestras y al Adw solamente dos, y por lo que toca a subtipos de Ay no -- fué posible identificar ninguno, posiblemente por-- tratarse de reacción cruzada. Parece haber en -- nuestro medio un predominio manifiesto del tipo Ad, y una baja prevalencia del Ay, lo cual debe tener -- implicaciones epidemiológicas que por el momento -- no es posible explicar.

Algunas de las muestras positivas utilizadas en las pruebas comparativas fueron obtenidas durante el corrimiento de muestras enviadas al laboratorio para diversos fines, que fueron los siguientes:

A) De 495 sueros obtenidos de una escuela primaria en la que se presentó una epidemia de hepatitis, -- todos resultaron negativos para antígeno y anti-- cuerpo por CEF, hallazgo que correlacionó satisfactoramente con los aspectos clínicos y epidemioló--

## CUADRO No. 9

## SUEROS POSITIVOS POR C.E.F. Y HARP

	C.E.F.	HARP
4164-02	1:32	1: 320
4201-01	1:32	1: 320
5322	1:16	1: 640
9445	1:16	1: 160
9550	1:16	1: 320
9689	1:16	1: 640
9723	1:16	1: 320
9789	1:16	1: 320
9836	1:16	1: 320
10077	1:16	1: 640
10107	1:16	1: 640
A.S.O.	1:16	1: 320
E.L.	1:16	1: 320
H.G.R.	1:32	1: 640
L.L.F.	1: 4	1: 160
M.P.	1:16	1: 640
Y.C.	1: 8	1: 160
D.R.	1:32	1:1280

## CUADRO No. 10

## SUEROS TIPIFICADOS POR MICROMETODO DE OUCHTERLONY.

1) D.R.	Adr - Ay débil	15) 5875	Adw
2) E.L.	Ad	16) 7352	Ad -- Ay
3) H.G.R.	Ad -- Ay	17) 9067	Ad
4) L.L.F.	Adw	18) 9348	Ad
5) M.P.	Adr	19) 9445	Ad
6) M.V.	Ad	20) 9550	Ad
7) 1471	Ad	21) 9689	Ad -- Ay
8) 1602	Ad	22) 9723	Adr
9) 2480	Ad	23) 9789	Ad
10) 3129	Ad	24) 9836	Ad -- Ay
11) 4164-02	Ad	25) 10077	Ad
12) 4201-01	Ad	26) 10107	Adr
13) 5322	Adr	27) 10298	Ad
14) 5778	Ad		

gicos del problema, ya que desde estos puntos de vista se trató de una epidemia por virus de hepatitis tipo "A".

B) De un estudio interno del hospital se procesaron 230 muestras por CEF, resultando todas negativas para antígeno y anticuerpos.

C) De 176 sueros recibidos de varias comunidades del estado de Chiapas (enviados por el Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste) dos muestras de Motozintla fueron positivas para el AgsHB, lo cual equivale al 1.13% del total de muestras recibidas y a su vez corresponde al 3.7% del total de muestras únicamente de Motozintla.

#### CARACTERISTICAS DE LAS COMUNIDADES.

<u>Población</u>	<u>No. de Habit.</u>	<u>No. de - muestras</u>	<u>% del total de la Poblac.</u>
Villa de Acala	13,000	42	0.32 %
Lacanja	120	30	25.0 %
Villa de Arriaga	27,000	50	0.18 %
V. de Motozintla	<u>28,000</u>	<u>54</u>	<u>0.19 %</u>
TOTAL	68,120	176	0.26 %

Es de llamar la atención el relativamente alto porcentaje de positividad en la Villa de Motozintla, además de que los títulos de AgsHB también son relativamente altos:

muestra 4164-02 Título = 320 por H.D. y 1:32 por CEF.  
 muestra 4201-01 Título = 320 por H.D. y 1:32 por CEF.

D) De un laboratorio automatizado de la SSA se procesaron 114 muestras seleccionadas por haber mos--trado valores alterados en pruebas de funcionamiento hepático; todas resultaron negativas al AgsHB y AcsHB por CEF.

E) El laboratorio de bioquímica del hospital suministró también 31 muestras de suero con pruebas --funcionales hepáticas alteradas, entre las cuales-- se detectaron dos casos positivos para AgsHB por --CEF.

Finalmente cabe aclarar que aquí no se reportaron resultados de F.C., a pesar de que se efec--tuaron numerosas pruebas, por la imposibilidad de-- contar con un suero anti AgsHB satisfactorio. To--dos los sueros anti probados mostraron título bajo, anticomplementaridad que fué imposible eliminar, o ambas cosas. Por tales razones no se consideró --conveniente incluir resultados de confiabilidad incierta.

## CAPITULO IX.

CONCLUSIONES.

La importancia de la detección del AgsHB está fuera de toda discusión, pero la diversidad metodológica hace necesaria la evaluación cuidadosa de los métodos disponibles, en base a factores como la sensibilidad, la especificidad, la complejidad, la rapidez y el costo. Para propósitos de mera detección, como es el caso habitual en el banco de sangre, el factor sensibilidad parece francamente secundario y quizá debiera darse prioridad a -- los aspectos de complejidad y costo.

Los resultados de este trabajo hacen evidente que el método más sensible (RIA) es incapaz de detectar más de un 5 - 10 % de positivos que métodos bastante menos sensibles en forma absoluta -- (CEF, FC). Puesto que la detección del 100 % de -- positivos no puede lograrse por ningún método en -- particular, sino que sería necesario correr cada -- muestra por varios métodos, las ventajas de una -- sensibilidad absoluta mayor no son definitivas en la selección de un método para propósitos rutina--rios, sobre todo si a ello se suman factores de alto costo y complejidad considerable.

El método de H.D. es de relativa sencillez y de suficiente sensibilidad, y no requiere de equipo costoso como el caso de RIA, por lo cual representa una excelente alternativa para laboratorios -- y bancos de sangre capaces de manejar metodología -- serológica en su variante micro.

El método de CEF ha confirmado en este trabajo sus ventajas reconocidas: gran sencillez, costo y sensibilidad aceptables. Es por estas razones, seguramente, que sigue siendo el método de elección en nuestro medio y en particular en los laboratorios y bancos de sangre de tamaño pequeño o mediano.

El método de I.D. en microplaca, como es bien sabido es de baja sensibilidad y por lo tanto no se le puede recomendar para trabajo rutinario de detección; sin embargo, es el único que nos permite establecer la identidad del antígeno y, en muchos casos puede ser adecuado para la confirmación de positividad.

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

- (1) Sawyer WA, Meyer KF, Eaton MD, Bauer JH, Putman P, Schwentker FF: Jaundice in Army personnel in the western region of the United States and its relation to vaccination against yellow fever. Amer J Hygiene 40 : 35, 1944.
- (2) Leurman: Eine Icterus epidemic; Berl Klin - - Wsch 22:20; 1885.
- (3) Stocker JH, Ruedmann R., Lemon WS: Epidemic - infectious jaundice and its relation to the - therapy of syphilis; Arch. Int Med 25; 521, - 1930.
- (4) Propert SA, : Hepatitis after prophylactic serum. Brit Med J. 2 ; 677, 1938.
- (5) Mac Nulty AS. : Ann Rep Chief Med Officer, - Minister of Health for year of 1937. London;- H.M. Stationery office.
- (6) Mac Callum TO, Stewart A, Bradley WH: Transmi ssion experiments in man. M.R.C. Special Report. Series 273; 1951.
- (7) Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S.: A "new" an tigen in leukemia sera. J A M A. 191; 541, -- 1965.
- (8) Prince AM,: An antigen detected in the blood- during the incubation period of serum hepatis. Proc Nat Acad Sci. USA. 60, 814; 1968.

- (9) Bancroft WH, Mundon FK, Russel PK: Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *The Journal of Immunology*; - 109, No. 4, 842, 1972.
- (10) Levene C, Blumberg BS, : *Nature* 221; 195, 1969. Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers.
- (11) Krugman S, Gile JP, Hammond J. Infectious hepatitis: Evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *J.A.M.A.* 200; 1967, 365.
- (12) Giles JP, Krugman S. Viral Hepatitis. Differential Diagnostic features between infections with tipe A and B viruses. *Amer. J. - Dis. Childs* 123; 4, 1972 pp. 281.
- (13) Ferris AA; Australia antigen and Down's syndrome: *Lancet* 1: 46, 1972.
- (14) Blumberg BS, Sutnick AI, London WT: Hepatitis and Leukemia: Their relationship to Australia antigen. *Bull. N.Y. Acad Med.* 44, - 1566; 1968.
- (15) Blumberg BS, Sutnick Ai, London WT. *Am. J. - Med.* 48, 1, 1970.
- (16) Alarcón-Segovia D., Fishoein E. Australia antigen in systemic lupus. *New Eng. J. Med* 284; 448, 1971.
- (17) Madalinski K, Brzosko WJ, Malczewski B, Czyzyk A: Au/HAA in sera of diabetic patients. *Lancet* 1, 701, 1971.

- (18) Krugman S., Giles JP, Hammond J: Viral hepatitis type B (MS-2 strain): Studies on active immunization. *J.A.M.A.* 127: 41, 1971.
- (19) Prince AM, Szmunes W, Woods KR, Grady GF: - Antibody against serum hepatitis antigen prevalence and potential use as immune serum -- globulin in prevention of serum hepatitis infection. *N. Eng J. Med.* 285 (17); 933, 1971.
- (20) Grob PJ, Jemelka H. Fecal SH-Antigen in Acute Hepatitis. *Amer. J. Dis. Child*: 123; 400, 1972.
- (21) Ferris AA, Kaldor J, Gust: Faecal antigen in viral hepatitis; *Lancet* 2; 243, 1970.
- (22) Blainey JD, Earle A, Flewett TH. Is the urine infective in serum hepatitis, *Lancet* 1, - 797, 1971.
- (23) Tripatzis I, Lübeck, Germany. Australia Antigen in Urine and Feces. *Amer. J. Dis. Child*: 123, 401, 1972.
- (24) Aklamar, Maumus, Epps, Leach, Warren: *Lancet* 1; 909 (letter) 1971.
- (25) Alp, Wright: *Gut* 12, 859, (Abstract).
- (26) Gell, Coombs. *Clínica Inmunológica*. 1970  
Edit. Salvat. 702.
- (27) Prince AM, Szmunes W, Woods KR, Grady: Antibody against serum hepatitis antigen prevalence and potential use as immune serum globulin in prevention of serum hepatitis infection. *N. Eng J. Med* 285 (17) 933, 1971.

- (28) Krugman S. Viral hepatitis type B: Projects for active immunization. *Developments in Biological Standardization*. Vol. 30; 1975, pp. 363.
- (29) Dane DS, Cameron C., Briggs M., *Lancet* 1, -- 1970, 695.  
Virus-like particles in serum of patiente - with Australia antigen-associated hepatitis.
- (30) Hoofnagle JH, Gerety RJ, Barker LF.  
Antibody to hepatitis "B" core antigen a sensitive indicator of hepatitis "B" virus replication. *New England Journal of Medicine* - 290, 1336; 1974.
- (31) Hoofnagle JH, Gerety RJ., Barker LF. 1973.  
Antibody to hepatitis B virus core in man. - *Lancet* 11, 869,
- (32) Le Bouvier GL, Mc Collum RW.; Australia (hepatitis-associated) antigen: Physicochemical and immunological characteristics. *Advances in Virus Research* 16; 357; 1970.
- (33) Alarcón-Segovia A., Fishbein E: Australia antigen in systemic lupus. *New Eng J. Med* 284; 448, 1971.
- (34) Jóswiak W., Koscielak J., Madalinski y col.; *Nature new Biol.* 229; 92 (letter).
- (35) Hirschman SZ, Vernace SJ., Schaffner F., 1971  
*Lancet* 1, 1099.
- (36) Almeida J., Waterson A. Immune complexes in hepatitis *Lancet* 11, nov. 8, 1969, 983.

- (37) Prince AM, y col. Hepatitis B antigen in -- wild-caught mosquitoes in Africa. *Lancet* 2,- 247; 1972.
- (38) Kim CY, Bissell DM; Stability of the lipid - and protein of hepatitis associated (Australia) antigen. *J. Infect. Dis.* 123; 470, 1971.
- (39) Brighton WD, Taylor PE, Zuckerman AJ: Nature new Biol. 232; 57, 1971.
- (40) Carver DH, Seto DS: *Science, N.Y.* 172, 1265; 1971.
- (41) Panouse-Perrin J., Courouc -Pauty AM, Rach-- man F.: Culture du virus B de L'hepatite; In International Symposium on viral Hepatitis, Mi lan, Dec, 1974. pp. 211.
- (42) Maurin J., Courouc -Pauty AM: Attempted Iso- lation of Hepatitis virus in Human Diploid - Cells. *Amer. J. of Diseases of Children* 123; No. 4; 314, 1972.
- (43) Methods of prevention and control of nosoco- mial infections National nosocomial Infec- - tions Study. Atlanta, Center for Disease Con- trol, U.S. Department of Health 1973; 13.
- (44) Sutnick AI, London WT, Millman I, Gerstley - BJS, Blumberg. Ergasteric hepatitis: Endemic hepatitis associated with Australia antigen- in a research laboratory. *Ann Intern Med.* 75: 35; 1971.
- (45) Turner, Field, Lasheen, Todd, White: 1970 *J. Clin. Path* 23; 826 (Abstract)

- (46) Marshall WC, London WT.: Amer. J. Dis. Child. 123, 378, Antígeno Australia en niños con -- malformaciones 1972, congénitas y en sus mámas.
- (47) Taylor PE: Present and Future trends in the laboratory diagnosis of Viral Hepatitis. International Symposium on viral hepatitis. Milan, Dec, 1974.  
Develop. Biol. Standard; 30; 41 (Karger 1975).
- (48) Taylor PE; Laboratory test for Australia -- (hepatitis-associated) antigen and antibody. British Medical Bulletin 28; 138; 1972.
- (49) Ashcavai M., Peters RL; Manual for hepatitis "B" antigen testing. W.B. Saunders company. 1973.
- (50) Martin Sosa S., Berron R: Involvement of -- complement and R A Factor in non-specific - agglutination of the latex reagent for HAA. Develop. Biol. Standard 30; 68; (Karger 1975).
- (51) Vyas GN, Shulman NR: Hemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis. Science 170; 332; 1970.
- (52) Ashcavai M., BS: Hemagglutination and hemagglutination inhibition. Ref. 49. pp. 195; -- 1973.
- (53) Laveran A., Mesnil F: Recherches morphologiques et experimentales sur le Trypanosome -- des rats. Ann Inst Pasteur 15; 673; 1901.

- (54) Levaditi C.: Sur l'état de la cytase dans le plasma des animaux normaux et des organismes vaccinés contre le vibron cholérique. Ann.-Inst. Pasteur 15; 894; 1901.
- (55) Nelson RA, Jr.: The immune adherence phenomenon: An immunologically specific reaction between microorganism and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis. Science 118; 733; 1953.
- (56) Kusuya Nishioka, M.D. Tokyo: Immune Adherence Hemagglutination for Detection of Australia-Antigen. Amer. J. Dis. Child 123; 406; 1972.
- (57) Walsh JH, Yallow R.; Berson SA : Detection of Australia antigen and antibody by means of RIA techniques. J. Infect. Dis. 121; 550; 1970.
- (58) Gerin, J.L., P. V. Holland, R. H. Purcell: - Australia antigen: Large-Scale purification from human serum and biochemical studies of its proteins. J. Virology 7: 569; 1971.
- (59) Purcell R., J. Gerin, P. Holland. Preparation and characterization of complement-fixing hepatitis-associated antigen and antiserum. J. Infec. Dis. 121: 222; 1970.
- (60) Bancroft WH; Mundon FK; Russell PK. Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. J. Immunol. 109; 842; 1972.

- (61) Bedarida G., Trinchieri G. y Carbonara A: -- The detection of Australia antigenic and anti-Au antibodies by a rapid procedure combining electrophoresis and immunoprecipitation. *Hematológica* 54; 591, 1969.
- (62) Gocke DJ, Calderon Howe: Rapid Detection of Australia antigen by Counterimmunoelectrophoresis. *The Journal of Immunology* 104; 1031, 1970.
- (63) Boyden SV. (1951) *J. Exp. Med* 93, 107.
- (64) Cayzer I., Dane DS, Cameron CW, Denning JV. A rapid haemagglutination test for hepatitis B antigen *Lancet* 1, 947. 1974.
- (65) Shuman NR, Barker LE: Virus like antigen, antibody, and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation. *Science* 165: 304, 1969.
- (66) Purcell RH, Holland PV, Walsh IH; A complement fixation test for measuring Australia antigen and antibody. *J. Infect. Dis* 120; 383, 1969.
- (67) Kabat E., Mayer M.: *Experimental Immunochimistry* (Ed. 2) Springfield, Charles Thomas.-149; 1961.
- (68) Lennette EH, Schmidt NJ. *Diagnostic Procedures for viral and Rickettsial Infections.* - American Public Health Association, Fourth Edition. New York. 1969.
- (69) Takatsy G. *Kiserl Orvostud* 2; 393, 1950.

- (70) Talmadge DW, Freter GG, Taliaferro WH; The effect of repeated injections of sheep red cells on the hemolytic and combining capacities of rabbit antiserums.  
J. Infect. Dis 98: 293, 1956.
- (71) Tesis: Navas Perez Aida: Anticuerpos Fijadores del complemento contra el virus de varicela zoster.  
Facultad de Química UNAM. 1976.
- (72) Aach, R.D., J. W. Grisham, and Parker C. W.: Detection of Australia antigen by radioimmunoassay.  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 68: 1056 - 1060.
- (73) Hollinger F.B., Vorndam V. and Dreesman G.R.: Assay of Australia antigen and antibody employing double-antibody and solid-phase radioimmunoassay techniques and comparison - - with the passive hemagglutination methods.  
J. Immunol. 107; 1099 - 1111.
- (74) Lander J.J., Alter H.J. and Purcell R.H.: -- Frequency of antibody to hepatitis-associated antigen as measured by a new radioimmunoassay technique.  
J. Immunol. 106: 1166 - 1171.
- (75) Walsh J.H., Yalow R. and Berson S.A.: Detection of Australia antigen and antibody by - means of radioimmunoassay techniques.  
J. Infec. Dis. 121: 550 - 554.

- (76) Ling C.M. and Overby L.R.: Prevalence of hepatitis B virus antigen es revealed by direct radioimmune assay with  $^{125}\text{I}$  antibody. J. Inmunol. 109: 834 - 841.



**Impresiones "ARIES"**

**COLOMBIA NUM. 2 ALTOS 2**

**(ESO. CON BRASIL)**

**MEXICO 1. D. F.**

**5-26-04-72**

**5-29-11-19**