

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

DETECCION DEL AgsHB POR EL METODO DE
HEMAGLUTINACION REVERSA PASIVA

T E S I S
QUE PARA OBTENER
EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA
GUADALUPE DIGNA MOREIRA MURADAS

MEXICO, D. F.

1978



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.

TESIS 1978

NO. U.C. 248
FECHA _____
PROC. _____

302 297
RAB



Jurado asignado:

PRESIDENTE: QFB Magdalena Acosta Segura

V O C A L : Dr. Oscar Amor Dodero

SECRETARIO: Dr. Salvador Martín Sosa

1er. SUPLENTE: QFB Leonor Martínez Soto

2do. SUPLENTE: QFB Lilia Vierna García

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Virología

Hospital del Niño, DIF

México, D. F.

Nombre completo del sustentante:

GUADALUPE DIGNA MOREIRA MURADAS

Nombre completo del asesor del tema:

SALVADOR MARTIN SOSA

Con cariño:

A mis padres, por el inmenso amor,
comprensión y apoyo que me han
brindado siempre.

A quienes me han brindado su
cariño y su apoyo:

Mis hermanos

Mis amigos

 Mi familia.

A mi sobrina Nanciña, por el
encanto de su sonrisa.

A mis maestros, por su
valiosa orientación.

Al Dr. Salvador Martín Sosa,
con profundo agradecimiento
por su apoyo y dirección en
la elaboración de éste tra-
bajo.

Al respetable jurado:
QFB Magdalena Acosta Segura
Dr. Oscar Amor Dodero
Dr. Salvador Martín Sosa
QFB Leonor Martínez Soto
QFB Lilia Vierna García
por su valiosa colaboración.

Al personal del laboratorio de
Virología del Hospital del Niño
DIF, por el apoyo y facilidades
proporcionadas para la elabora-
ción y desarrollo del tema.

CONTENIDO

Capítulo	Pág.
I.- Objetivo	1
Introducción	2
- Generalidades sobre hepatitis virales.	2
- Antecedentes históricos sobre el AgsHB.	10
- Nomenclatura.	13
- Virología.	14
- Transmisión.	17
II.- Metodología.	
- Microscopía electrónica	19
- Inmunofluorescencia.	19
- Inmunodifusión.	20
- Agregación de plaquetas.	20
- Contraimmunoelectroforesis.	20
- Reoforesis.	21
- Fijación de complemento.	21
- Hemaglutinación indirecta.	22
- Hemaglutinación reversa pasiva.	22
- Radioinmunoanálisis.	22
III.- Generalidades sobre el método de hemaglutinación reversa pasiva.	25

IV.- Material y métodos.	27
- Método para preparar suero anti-AgsHB	29
- Obtención del suero anti-AgsHB.	30
- Purificación de la globulina anti-AgsHB.	31
- Estabilización de los eritrocitos de carnero.	33
- Sensibilización de eritrocitos de carnero.	35
- Prueba de hemaglutinación reversa pasiva.	37
V.- Resultados.	40
VI.- Resumen.	51
VII.- Conclusiones.	53
VIII.- Bibliografía.	54

CAPITULO I.

OBJETIVO.

El objetivo principal de este trabajo es analizar críticamente la técnica de Hemaglutinación reversa pasiva para la detección del antígeno asociado a la hepatitis B (AgSHB), para confirmar sus ventajas e inconvenientes y para definir su complejidad por lo que se refiere a la preparación de los reactivos biológicos necesarios.

CAPITULO I

INTRODUCCION.

Se acepta que Hipócrates fue el primer autor que describió la hepatitis vírica bajo la denominación de "ictericia epidémica " o cuarto tipo de ictericia, habiendo sido llamada antes " ictericia leptospiral ", " ictericia catarral " e " ictericia infecciosa ". Se han realizado descripciones de sus características epidémicas, debido a su carácter contagioso, constituyendo hoy en día una verdadera endemia mundial. (1)

La hepatitis (aparte de ocasionarle grandes molestias al paciente), es una enfermedad capaz de afectar al organismo en forma seria. Presenta el inconveniente adicional de ser una afección de larga duración, que a menudo se prolonga por varios meses. En los últimos años, los casos de hepatitis han aumentado. Es por ésto precisamente, que las autoridades de salud pública han insistido en la necesidad de divulgar una información concreta y clara relativa a esta enfermedad. Estando mejor informados sobre la misma, todos podemos hacer un esfuerzo más inteligente y eficaz para evitar contraerla y si llega a manifestarse, para atenderla en la forma más adecuada posible.

Sin embargo, y a pesar de los intensos esfuerzos, la hepatitis viral continúa siendo uno de los principales problemas infectológicos no resueltos hasta ahora. El problema se concentra en la persistente dificultad que existe para cultivar " in vitro " a los agentes etiológicos que son responsa-

bles de la hepatitis viral en el humano. Este obstáculo entorpece un estudio cuidadoso del padecimiento, y ha impedido tanto la caracterización plena de los agentes etiológicos como el desarrollo de vacunas apropiadas. (2)

El conocimiento de la historia natural de la enfermedad, se ha visto obstaculizado por la imposibilidad de transmitirla a los animales de experimentación, si bien recientemente se ha logrado producir la infección por el virus tipo A en monos americanos (marmosets) (4). Los intentos de aislamiento de virus por medio de cultivo de tejidos, los estudios con cultivos de hepatocitos embrionarios y de leucocitos han aportado valiosas informaciones etiológicas, aunque no suficientes para identificar el agente causal.

CONCEPTOS:

Hepatitis viral: enfermedad aguda o crónica caracterizada por una inflamación del hígado. Los virus que la producen lesionan las células e incluso pueden destruirlas, perdiendo así la facultad de realizar una de las funciones más importantes del hígado: la excreción de bilirrubina que normalmente debe incorporarse a la bilis; debido a ello se acumula en la sangre y da lugar a la llamada ictericia que es el síntoma más característico de la hepatitis, aunque en ciertos casos se produce la forma " anictérica " de hepatitis viral.

En el concepto de hepatitis vírica se incluyen dos tipos de infecciones: I) Hepatitis infecciosa (hepatitis epidémica) causada por el virus tipo A; y II) Hepatitis sérica (hepatitis por inoculación, hepatitis postransfusional, ictericia sérica homóloga, HS, hepatitis B), producida por el virus ti-

po B.

Ambas son causadas por virus cuya acción patógena es bastante parecida. Los síntomas que presentan son indistinguibles: anorexia, malestar, fiebre intermitente, náuseas, vómito, diarrea y área hepática hipersensible y dolorosa. Alrededor de una semana mas tarde, el paciente se siente temporalmente mejor hasta que se manifiesta la ictericia, la orina se oscurece y las heces se tornan pálidas y de consistencia pastosa. Se observa esplenomegalia aproximadamente en el 15% de los casos. Puede presentarse prurito generalizado e intenso, urticaria y diarrea intermitente. Las pruebas hepáticas y de química sanguínea muestran elevación de los niveles enzimáticos (siendo los más característicos los de las transaminasas glutámico oxalacética y glutámico pirúvica). La recuperación toma de 6 - 8 semanas, pero la lascitud y la depresión pueden persistir por más tiempo.

La enfermedad es más benigna en los niños que en los adultos. En realidad la mayoría de las infecciones en los niños son anictéricas y muchas más son completamente inaparentes. La mortalidad varía de 0 - 1% (éste porcentaje puede verse aumentado en el caso de hepatitis producida por el virus tipo B), la mayoría de las muertes ocurren en adultos, éstos generalmente son casos en los que la infección progresa de hepatitis activa a subaguda o crónica en ocasiones complicada por cirrosis hepática.

En la hepatitis tipo A, el virus penetra por ingestión de materiales infectados (vía fecal-oral); no se ha descartado la posibilidad de que la contaminación también ocurra por la relación persona a persona, debido a que el virus es-

tá presente en las secreciones nasofaríngeas, y también puede ocurrir la transmisión por vía parenteral. Aparece en forma de pequeñas epidemias estacionales (otoño-invierno) o esporádicamente durante todo el año; tiene un período de incubación de 15 - 50 días. El período de viremia es de 3 - 7 días antes de la aparición de la ictericia hasta tres días después. Este tipo de hepatitis confiere inmunidad permanente; sin embargo, no existe inmunidad cruzada con la hepatitis sérica. Se puede dar como tratamiento gammaglobulina humana (0.02 ml/kg por vía intramuscular), siendo el período de protección de 6 meses. (4-6)

La hepatitis tipo A (hepatitis infecciosa) es una enfermedad endémica en ciudades o regiones donde la higiene y sanidad continúan siendo primitivas (1-7).

Hepatitis tipo B.- En este tipo de hepatitis el virus generalmente penetra por vía parenteral, al transfundir sangre o sus derivados contaminados, o por el uso de materiales punzocortantes no estériles y contaminados, en la hepatitis postransfusional, la frecuencia depende del número de unidades de sangre aplicadas (250 ml/unidad) (7). Más recientemente se ha encontrado que este virus puede ser transmitido por el semen y a través de placenta (8); además, el antígeno asociado a la hepatitis B ha sido recuperado prácticamente de todos los líquidos corporales (suero, orina, heces, líquido ascítico, líquido pleural, saliva y secreciones vaginales) (2, 8-11), por lo que debe reconocerse la posibilidad de que exista una transmisión oral, respiratoria y venérea para la hepatitis tipo B. También es posible la transmisión por insectos hematófagos (8).

El período de incubación varía de

45 - 160 días, siendo en algunas ocasiones mayor. El período de viremia va desde 8 - 9 días antes del inicio de los síntomas hasta 8 días después de la aparición de la ictericia (9). En algunos casos se ha demostrado que el virus permanece en el suero de algunos individuos por varios años.

La hepatitis tipo B tiende a ser más severa y en ocasiones llega a requerir hospitalización, presenta períodos de morbilidad mas prolongados y ocasionalmente tiende a evolucionar hacia una hepatitis fulminante, a menudo fatal. La hepatitis B, como han demostrado estudios histopatológicos seriados y estadísticos, evoluciona hacia la cirrosis con mayor facilidad que la hepatitis tipo A. La gammaglobulina humana no tiene efecto (1-7).

VARIACION EN LA RESPUESTA A LA INFECCION CON HEPATITIS B.

Existe una variedad de respuestas a la infección:

- a) Desarrollo de hepatitis aguda, progresando a una recuperación completa. Aparición transitoria de AgsHB y anti-AgCHB. Aparición subsecuente de anti-AgsHB que puede ser persistente.
- b) Desarrollo de hepatitis aguda que evoluciona a hepatitis crónica. El AgsHB y anti-AgCHB son usualmente persistentes.
- c) Hepatitis crónica con síntomas y hallazgos de enfermedad hepática crónica que no estuvo precedida por un episodio de hepatitis aguda. El AgsHB y anti-AgCHB son persistentes.
- d) Estado portador. El AgsHB y anti-AgCHB son persistentes.

El portador es asintomático pero puede tener ligeras anormalidades bioquímicas del hígado.

e) Desarrollo de anti-AgsHB persistente sin AgsHB o síntomas detectables.

f) AgsHB persistente en pacientes con una enfermedad fundamental adquirida, asociada con anormalidades inmunológicas como: síndrome de Dawn, lepra lepromatosa, enfermedad renal crónica, leucemia, carcinoma hepático primario, Usualmente asociadas con hepatitis anictéricas.

g) Formación de complejos antígeno-anticuerpo que pueden estar asociados con ciertas enfermedades inmunes tales como periarteritis nodosa.

- Respuesta del huésped a antígenos humanos y virus de la hepatitis B: Transplantes de riñón.-

Los pacientes que han desarrollado anticuerpos anti-AgsHB tienen, significativamente, mayores probabilidades de rechazar riñones transplantados que los pacientes portadores del AgsHB. Los riñones donados por hombre tienen mayor probabilidad de ser rechazados por pacientes con anti-AgsHB que por pacientes sin anti-AgsHB. Estas diferencias no se observaron cuando los riñones fueron donados por mujeres (8).

- Relación del AgsHB con el sexo de los hijos y la fertilidad de los padres infectados.-

Se encontró que si uno u otro padre fue un portador de AgsHB, la pareja tuvo más hijos varones que otras. Se ha encontrado también que existe una deficiencia de hijos varones cuando los padres tienen anti-AgsHB, lo cual puede ser consecuencia de mortalidad masculina diferencial durante el período " in útero "

por lo que se está estudiando si el anti-AgsHB tiene especificidades antigénicas en común con Hy u otros antígenos de histocompatibilidad determinados por genes en el cromosoma Y (8).

- Relación del AgsHB con el carcinoma hepático primario.-

Con el advenimiento de pruebas más sensibles para la detección del AgsHB se probó que hay una sorprendente asociación de la hepatitis B con el carcinoma hepático primario (8).

CUADRO I

DIFERENCIAS ENTRE HEPATITIS TIPO A Y TIPO B

	Hepatitis A	Hepatitis B
Agente etiológico	Virus A	Virus B
Tamaño del virus	Desconocido	42 nm
Resistencia al calor	Resiste 56°C/30'	Resiste 60°C/4h
Resistencia al frío	Resiste congelación	Resiste congelación y liofilización
Respuesta a agentes químicos	Tolera cloro residual 1 ppm	No se afecta con éter fenol 0.25%, alcohol y mertiolate 0'5%
Vía de infección	Fecal-oral y parenteral	Parenteral, fecal-oral, transplacentaria, venérea, por insectos y secreciones
Virus en sangre	En fase aguda	En período de incubación y fase aguda
Período de incubación	15 - 50 días	45 - 160 días
Tipo de iniciación	Súbito	Insidioso
Fiebre mayor de 38°C	Común	Poco frecuente
Frecuencia por edades	Niños y adultos jóvenes	Todas las edades
Frecuencia estacional	Otoño - Invierno	Todo el año
Indicadores serológicos	Desconocidos	AgSHB y anti-AgSHB AgCHB y anti-AgCHB
Inmunidad	Homóloga	Homóloga
Valor profiláctico de la gammaglobulina	Bueno	Ninguno
Severidad	Leve, a menudo anictérica	Severa, habitualmente ictérica
Enfermedad crónica	Desconocida	30% de casos de hepatitis crónica

ANTECEDENTES HISTORICOS SOBRE EL AgsHB.-

El descubrimiento del agente infeccioso asociado con la hepatitis B y la elucidación de nuevos mecanismos para su diseminación son la consecuencia de una serie de estudios.

En el verano de 1960 Allison y Blumberg decidieron probar la hipótesis de que pacientes que recibieron gran número de transfusiones pueden desarrollar anticuerpos contra una o más de las proteínas séricas polimórficas (conocidas o desconocidas) que por sí mismas no son heredadas (8), pero que tienen los donadores de sangre. Usaron la técnica de doble difusión en gel de agar de Ouchterlony para ver si se habían formado anticuerpos de precipitación en los pacientes transfundidos, los cuales reaccionarían con los constituyentes presentes en sueros de personas normales. Después de probar cierto número de sueros de pacientes politransfundidos (personas que han recibido 25 o más unidades de sangre), encontraron un suero que contenía un anticuerpo precipitante, desarrollado en la sangre de un paciente que había recibido varias transfusiones como tratamiento de una anemia. Posteriormente encontraron que el anticuerpo reaccionaba con especificidades antigénicas heredadas sobre lipoproteínas de baja densidad. Continuaron investigando para otros sistemas de precipitación en los sueros de pacientes transfundidos.

En 1963, estudiando los sueros de pacientes hemofílicos, encontraron un suero que dió una banda de precipitación diferente de las conocidas; tenía una configuración diferente, no se teñía rápidamente con negro Sudán, lo cual indicó un bajo contenido de lípidos, pero se tiñó de rojo con azocarmín,

indicando que su componenete principal era proteico. Este suero fue probado con otros sueros, reaccionando solamente con uno del lote, el cual pertenecía a un aborígen australiano, por lo -que fue llamado antígeno Australia.

El siguiente paso fue coleccionar información sobre la distribución del antígeno Australia y anticuerpos anti-antígeno Australia en diferentes poblaciones humanas y grupos de enfermedades. Fue muy raro en poblaciones aparentemente normales en cuanto a clima e higiene; en cambio fue bastante común en algunas poblaciones tropicales y asiáticas.

Visnich encontró que en los sueros de pacientes leucémicos existe una alta frecuencia de antígeno Australia, Posteriormente se procedió a probar sueros de pacientes con otras enfermedades, encontrándose antígeno Australia sólo en los sueros de pacientes politransfundidos. De estas observaciones se concluyó que los individuos que tienen antígeno Australia tienen mas probabilidad de desarrollar leucemia que los que no tienen dicho antígeno y viceversa, los individuos que presentan alta probabilidad de desarrollar leucemia son mas tendientes a tener antígeno Australia. También se encontró que pacientes con síndrome de Dawn tienen mayor probabilidad de desarrollar leucemia que otros individuos y en este grupo la presencia del antígeno Australia fue frecuente (15).

Se encontró que la presencia o ausencia de antígeno Australia parece ser un rasgo individual consistente. Si el antígeno Australia estuvo presente en la prueba inicial persiste en las siguientes pruebas y por el contrario, si estuvo au-

sente inicialmente, no aparece en una segunda prueba. En 1966 se encontró que un paciente con síndrome de Dawn que originalmente había sido negativo al antígeno Australia, tenía antígeno Australia en una segunda prueba; aparentemente había desarrollado una nueva proteína y debido a que muchas proteínas son producidas por el hígado, se realizaron pruebas de química hepática, las cuales mostraron que entre la primera prueba (negativa) y la segunda prueba (positiva) se había desarrollado una forma de hepatitis crónica anictérica. El diagnóstico de hepatitis fue confirmado por biopsia hepática. De aquí surgió la idea de probar la hipótesis de que el antígeno Australia estuvo relacionado con la hepatitis. Primero se compararon los niveles de transaminasa glutámico pirúvica sérica (TGPS) en individuos con síndrome de Dawn que han tenido antígeno Australia con otros que no lo han tenido. Los niveles de TGPS fueron ligeros pero significativamente más altos en los antígeno Australia positivos. Segundo: se tomaron muestras de individuos con hepatitis aguda los cuales presentaron antígeno Australia al principio de su enfermedad, pero el antígeno desapareció de su sangre a los pocos días o semanas. A fines de 1966, se encontró que el antígeno Australia estaba asociado con la hepatitis viral aguda.

En 1967, Okochi confirmó el descubrimiento de Blumberg y col. y procedió a hacer el primer estudio definitivo de transfusiones, encontrando que el antígeno Australia se transmite por transfusión, y que algunas personas desarrollan anticuerpos contra el antígeno Australia. La asociación del antígeno Australia con la hepatitis fue también confirmada en 1968 por Alberto Vierucci (8).

NOMENCLATURA

- AgsHB.- Antígeno de la hepatitis B encontrado en la superficie de la partícula Dane (42 nm) y sobre las partículas libres de 20 nm.
- AgCHB.- Antígeno de la hepatitis B encontrado en el centro de la partícula Dane.
- Partícula Dane.- Un término común para la partícula de 42 nm que presenta AgCHB en su centro y AgsHB en su superficie.
- VHB.- Reservado para el virus de la hepatitis B. Actualmente se acepta que la partícula Dane es este virus.
- AgsHB/adr.- Antígeno superficial de la hepatitis B manifestando el grupo determinante específico a y subtipos de determinantes específicos d y r.
- Anti-AgsHB.- Anticuerpo contra el antígeno de superficie de la hepatitis B. Si la reactividad subtípica es conocida, los determinantes antigénicos apropiados deben ser indicados para el manejo correcto.
- Anti-AgCHB.- Anticuerpo contra el antígeno central de la hepatitis B. Si es descubierto más de un antígeno central debe ser indicado.

VIROLOGIA.

Se han utilizado métodos virológicos para el estudio de virus de la hepatitis B, los cuales no han sido útiles.

Dane, Cameron y Briggs, utilizando microscopía electrónica, identificaron una partícula esférica de cerca de 42 nm de diámetro con un centro opaco al paso de electrones, de cerca de 20 nm. Es probable que esto represente la partícula viral completa. Ambas partículas contienen antígeno Australia en su superficie, el cual es llamado ahora antígeno de superficie de la hepatitis B (AgSHB). El antígeno superficial puede ser removido de las partículas Dane por la acción de detergentes para descubrir el centro, el cual tiene su propio antígeno: antígeno central de la hepatitis B (AgCHB) en sangre humana. Los anticuerpos anti-AgSHB se encuentran en sangre periférica después de la infección y pueden persistir por muchos años; también se puede detectar en personas que no han tenido hepatitis clínica. Los anticuerpos anti-AgCHB se asocian generalmente con el estado de portador (AgSHB persistente en la sangre), pero puede ocurrir sin él. Los anticuerpos anti-AgCHB se encuentran comunmente durante la fase activa de la hepatitis aguda, antes del desarrollo de los anticuerpos anti-AgSHB, pero no persisten tanto como éstos últimos. El AgCHB no ha sido identificado como tal en sangre periférica (2,8)'

Se ha aislado ADN de los centros de las partículas Dane y parece tener regiones de filamento doble y sencillo (2,8).

Por medio de estudios de inmunofluorescencia y de microscopía electrónica, las partículas pequeñas

(20 nm) del virus de hepatitis B han sido identificadas únicamente en el núcleo de células hepáticas de pacientes infectados; el AgsHB externo se encuentra en el citoplasma. Se piensa que el ensamble de las partículas grandes ocurre en el citoplasma y que tanto partículas pequeñas como grandes (antígeno de superficie solamente) emergen de las células y eventualmente encuentran su camino a la sangre periférica (16).

La pequeña partícula del antígeno que mide 20 nm de diámetro ha sido separada por enfoque isoeléctrico, confirmándose la heterogenicidad del antígeno por el hallazgo de polipéptidos, cuya naturaleza integral depende de la partícula de que provienen, de donde se concluye que la variación antigénica de superficie es una función de heterogenicidad proteica del virus (17).

Actualmente se reconocen cuando menos cuatro subtipos antigénicos del AgsHB, denominados con las letras d, y, w, r.

Subtipificando al AgsHB en pacientes con hepatitis B aguda, se encontró el subtipo "ay" en un 75%, mientras que el subtipo "ad" fue más común en portadores crónicos asintomáticos del AgsHB (81% de donadores de sangre). Antes de mayo de 1972, el subtipo "ad" se encontró en el 67% de los pacientes, mientras que más tarde dominó el subtipo "ay" en un 93%. La distribución desigual de subtipos entre las formas aguda y crónica de la hepatitis B ha sido explicada por las diferencias en el contagio y virulencia de las clases de virus (2, 18, 21).

El virus de la hepatitis B parece tener solamente una pequeña cantidad de ácido nucleico, probablemente solo lo suficiente para codificar algunas proteínas. La mayor parte

de la cubierta (y posiblemente otras porciones del virus) pueden ser producidas por los genes del huésped. Millman y colaboradores encontraron que el antígeno de superficie contiene material con especificidades antigénicas en común con proteínas séricas, incluyendo la IgG, transferrina, albúmina, beta-lipoproteínas y otras. Si esto es cierto, el carácter antigénico del virus sería al menos en parte, una consecuencia de las características del huésped del que proviene (8). Esto explicaría el desarrollo del estado portador (presencia del AgsHB en la sangre de un individuo, sin tener manifestaciones clínicas), el cual es dependiente del huésped y su prevalencia es modificada por su origen étnico, sexo y edad, presentándose principalmente en hombres jóvenes. Esto es, si una persona es infectada con partículas de AgsHB que contengan proteínas antigénicamente muy similares a las suyas propias, ésta persona tendrá una respuesta inmunológica pequeña y tenderá a desarrollar una infección persistente con el virus. Por otro lado, si las proteínas del agente son antigénicamente diferentes de las suyas, la persona desarrollará una respuesta inmune al virus (formación de anti-AgsHB) y presentará una infección transitoria. Durante el curso de la infección en esa persona se sintetizarán nuevas partículas que contendrán características antigénicas propias. Esta persona puede infectar a otra persona presentándose las mismas alternativas (1-8, 22).

TRANSMISION

El AgsHB puede ser transmitido por diversas vías ya que ha sido recuperado prácticamente de todos los líquidos corporales: suero, orina, heces, líquido ascítico, líquido pleural, saliva, secreciones vaginales y sémen; también puede ser transmitido a través de placenta, ruta fecal-oral e insectos hematófagos.

- Transmisión por transfusiones.- La aplicación de técnicas sensibles para la detección del AgsHB y anti-AgsHB, indican que la infección por virus de la hepatitis B es responsable solamente del 25% a 50% de todos los casos de hepatitis postransfusional. Se ha comprobado que el título de la sangre transfundida no tiene relación aparente con la severidad, período de incubación o positividad al antígeno de la enfermedad provocada.

- Transmisión venérea.- Es una transmisión en forma vertical. De acuerdo con hipótesis genéticas, el agente puede ser transmitido con el material genético, entrando los virus a los núcleos de las células huésped, y en generaciones subsiguientes actúa como un rasgo mendeliano.

- Transmisión a través de placenta.- Los datos sugieren un efecto materno (paso a través de placenta) ya que la mayoría de los hijos fueron portadores persistentes cuando la madre fue un portador que cuando el padre fue un portador. Se ha demostrado que mujeres portadoras o que han sufrido hepatitis B aguda durante el embarazo o al momento del parto, pueden transmitir el virus de la hepatitis B a sus hijos, quienes también serán portadores. Sin embargo esta transmisión se puede ver afectada por ca-

racterísticas biológicas, condiciones del parto e interacción madre-hijo (8).

- Transmisión por insectos hematófagos.- Varios investigadores han detectado AgsHB en mosquitos colectados en áreas donde el AgsHB es común en la población humana, como en Anopheles gambiae y otras especies. No se sabe si el virus de la hepatitis B (VHB) se replica en mosquitos, pero se ha detectado en ellos semanas después de su alimentación, así como en sus huevecillos. Se han realizado experimentos con la chinche americana Amex lectulorius, mostrando que también puede ser portadora. Se ha encontrado también una alta proporción de infección en la chinche tropical Cimex hemipterus, tomadas de las camas de individuos portadores conocidos (8, 19).

CAPITULO II.

GENERALIDADES SOBRE METODOLOGIA PARA LA DETECCION DEL
ANTIGENO ASOCIADO A LA HEPATITIS B.

El descubrimiento del antígeno Australia por Blumberg, Alter y Visnich (1965), y el subsecuente reconocimiento de su asociación con la hepatitis viral, dió lugar a una investigación más extensa de la hepatitis. Debido a ésto, ha sido de suma importancia el desarrollo de métodos serológicos sensibles para la detección del AgsHB, su distribución y asociación con varias enfermedades hepáticas. Actualmente existe una variedad de métodos para la detección del antígeno Australia y sus correspondientes anticuerpos.

Entre los métodos utilizados para la detección de las partículas virales se encuentran:

- Microscopía electrónica.- Se utiliza para la identificación y estudio de la estructura del AgsHB. Es sumamente útil para la detección de complejos antígeno-anticuerpo, pequeñas concentraciones del antígeno y variantes del mismo. Presenta como ventajas: sensibilidad, rapidez, permite localizar el antígeno o el complejo en el tejido hepático y en el interior de las células infectadas. Desventajas: Equipo costoso y personal especializado.

- Inmunofluorescencia.- Utilizada para la localización e identificación del antígeno asociado a la hepatitis B en las células hepáticas.

Entre los métodos serológicos utilizados para la detección del AgsHB se encuentran:

- Inmunodifusión o doble difusión en gel de agar.- Se basa en la difusión que sufren el antígeno y el anticuerpo a través de una capa de gel de agar, de manera que en el punto donde se encuentran ocurre una reacción antígeno-anticuerpo, formando una banda de precipitación visible a simple vista. Es la técnica conocida como inmunodifusión en gel de agar.

Ventajas: sencillez, economía de reactivos (en la variante micro de Ouchterlony), fácil interpretación de los resultados, posibilidad de observar identidad entre variantes antigénicas.

Desventajas: Sensibilidad baja, tiempo requerido para su realización (1-7 días).

- Agregación de plaquetas.- La interacción del complejo AgsHB-anti-AgsHB con la superficie de plaquetas sanguíneas resulta en la agregación de plaquetas y cambio consecuente en la sedimentación de las mismas. Esta técnica provee un método para la detección del antígeno Australia y su correspondiente anticuerpo, y sirve también como un sistema indicador de la presencia de complejos inmunes. Sin embargo, no se recomienda su uso a gran escala, debido a la variación en sensibilidad individual de las plaquetas, pudiendo ocurrir reacciones falsas positivas debidas a factores no inmunológicos (4).

- Contraimmunoelectroforesis.- Basada en la migración electroforética del antígeno (hacia el ánodo) y del anticuerpo (hacia el cátodo), por la acción de un flujo eléctrico a través de una capa de agarosa.

Ventajas: sencillez, rapidez, repro-

ducibilidad, fácil interpretación que puede favorecerse por tinción de las bandas de precipitación.

Desventajas: sensibilidad relativamente baja, menor que fijación de complemento; sin embargo, se puede lograr mayor sensibilidad, semejante a fijación de complemento, con una selección apropiada del anticuerpo empleado.

- Reoforesis.- Es una técnica mejorada de difusión en gel de agar para la detección del AgsHB en la cual una simple modificación induce que los sueros problema, colocados en los pozos periféricos de un patrón de prueba hexagonal rodeado por un foso que contiene amor^tbiguador, para que fluyan solamente hacia el pozao central que contiene anticuerpo y no radialmente, lográndose con ésto una mayor sensibilidad.

Ventajas: sensibilidad mediana, se puede observar identidad antigénica y subtipos.

Desventajas: tiempo requerido para su realización, presencia de reacciones falsas positivas.

- Fijación de complemento: Util para realizar una determinación cuantitativa de una comparación serológica de diferentes preparaciones de antígeno y anticuerpo.

Ventajas: técnica más sensible que inmunidifusión en gel de agar y que contrainmunolectroforesis. Su sensibilidad relativa es de 100 a 200 veces mayor para el AgsHB y de 20 a 40 veces mayor para el anti-AgsHB.

Desventajas: tiempo requerido, puede presentar efectos de prozona, existencia de sueros anticomplementarios (presencia de complejos Ag-Ac), técnica laboriosa.

- Hemaglutinación indirecta.- Basada en la reacción de inmunoadherencia: reacción inmunológica " in vitro " entre eritrocitos sensibilizados con antígenos y su anticuerpo correspondiente; es dependiente de la temperatura, y ocurre mejor a 37°C que a 0°C, y detecta cantidades muy pequeñas de anticuerpo (0.003 a 0.006 μ g).

Ventajas: sencillez, rapidez, sensibilidad, economía de reactivos, especificidad relativamente alta, reproducibilidad.

Desventajas: presencia de anticuerpos antiproteicos pudiendo dar reacciones falsas positivas; tiempo requerido (aproximadamente 3 horas).

- Hemaglutinación reversa pasiva: Prueba inmunológica con la que puede demostrarse de modo sencillo la presencia en sangre del AgsHB, permite hacer determinaciones cualitativas o semi-cuantitativas.

Ventajas: prueba particularmente rápida y simple, con gran sensibilidad. Es ligeramente menos sensible que el radioinmunoanálisis, presencia de un porcentaje muy bajo de reacciones falsas positivas, es considerablemente más sensible que inmunodifusión en gel de agar, contra inmunolectroforesis y fijación de complemento.

Desventajas: sensibilidad menor que radioinmunoanálisis.

-Radioinmunoanálisis: Detección del AgsHB, utilizando anticuerpos marcados con isótopos radioactivos.

Ventajas: alta sensibilidad, no hay

presencia de reacciones falsas positivas, reproducibilidad.

Desventajas: costo del material, tiempo requerido, equipo y personal especializado, riesgos por manejo de material radioactivo.

CUADRO II.

COMPARACION DE VARIAS TECNICAS PARA
LA DETECCION DEL AgsHB.

Método	Detecta	Sensibilidad
Difusión en el de agar	Ag y Ac	Baja
Aglutinación de partículas de látex	Ag	Mediana
Contrainmunolectroforesis	Ag y Ac	Mediana
Reoforesis	Ag	Mediana
Fijación de complemento	Ac	Alta
Hemaglutinación indirecta	Ac	Alta
Inhibición de la hemaglutinación	Ag	Alta
Hemaglutinación reversa pasiva	Ag	Alta
Radioinmunoanálisis	Ag	Muy alta

CAPITULO III.

GENERALIDADES SOBRE EL METODO DE HEMAGLUTINACION REVERSA
PASIVA.

La hemaglutinación reversa pasiva es una reacción antígeno-anticuerpo que provoca la aglutinación de eritrocitos indicadores inertes, cubiertos con un anticuerpo inmunológicamente puro. Muchos anticuerpos pueden cubrir los eritrocitos por la acción de varios agentes químicos de ligazón, lo cual permite detectar pequeñísimas cantidades de antígeno presente que no son detectables por pruebas de inmunoprecipitación en gel de agar. Los principios de enlace competitivo entre antígeno y anticuerpo forman las bases conceptuales para la hemaglutinación.

El método de hemaglutinación reversa pasiva es sensible para detectar de 0.003 a 0.006 μ g de nitrógeno proteico del antígeno. Los eritrocitos de carnero, cuando son tratados con una solución diluída de ácido tánico, aumentan su propiedad de adsorber proteínas en su superficie. Dichos eritrocitos cubiertos con proteína son aglutinados por un antígeno contra el cual está dirigida la proteína adsorbida en ellos.

Si en el suero problema no se encuentra presente el antígeno, estos eritrocitos cubiertos con el anticuerpo sedimentarán en el fondo, formando un botón homogéneo, de tal forma que el título del suero problema positivo será la máxima dilución del suero problema que no presente botón.

La técnica de hemaglutinación reversa pasiva presenta como ventajas las siguientes: rapidez, bajo cos-

to, especificidad relativamente alta, reproducibilidad, producción de muy pocas reacciones falsas positivas.

En el caso de la detección del AgsHB ésta técnica es más sensible que inmunodifusión en gel de agar de Ouchterlony, contraelectroforesis, fijación de complemento y casi tanto como radioinmunoanálisis.

CAPITULO IV.

MATERIAL Y METODOS.

Reactivos: Cloruro de sodio 0.15 moles/litro

Glutaraldehído (25%)

Solución de fosfatos 0.15 moles/litro pH 8.2

Agua destilada

Timerosal 1:10,000

Acido tánico 1:2,000

Amortiguador de fosfato-salina 0.15 mol/litro pH 7.2
más suero normal de cuy 0.25%

Solución salina isotónica

Alumbre potásico al 10%

Hidróxido de sodio 5 mol/litro al 20%

Solución saturada de sulfato de amonio

Hidróxido de sodio 2 mol/litro

Amortiguador de boratos

Material: Jeringas desechables de 1 ml

Agujas desechables del número 20 y 22

Pipetas graduadas de 0.1, 1, 5 y 10 ml

Matraces aforados de 50 y 100 ml

Vasos de precipitados de 100, 150 y 250 ml

Tubos de ensayo 13 x 100 mm

Tubos de centrifuga 44 x 142 mm

Probetas de 50 y 100 ml

Pipetas Pasteur

Recipiente para diálisis

Bolsas para diálisis

Placas para microtitulación con fondo en U

Microdilutores con capacidad de 0.025 ml

Pipetas calibradas de 0.025 ml

Baño de agua a 37°C

Agitador magnético y magneto de vidrio o teflón

Potenciómetro

Centrífuga refrigerada

Refrigerador a 4°C

Congelador a -20°C y -60°C

Papel parafilm

Material biológico: Sueros humanos positivos y negativos para AgsHB

Suero anti-AgsHB preparado en cuy

Suero normal de cuy

Eritrocitos de carnero

METODO PARA PREPARAR SUERO ANTI-AgsHB.

- 1).- Diluir 25 ml de una mezcla de sueros humanos positivos para AgsHB con 80 ml de agua destilada.
- 2).- Agregar 90 ml de solución al 10% de alumbre potásico $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4 \cdot 24 \text{H}_2\text{O}$ en agua destilada.
- 3).- Ajustar el pH a 6.5 con hidróxido de sodio 5 moles/litro al 20% y centrifugar.
- 4).- Lavar el sedimento dos veces con 200 ml de solución salina que contenga timerosal 1:10.000 cada vez.
- 5).- Suspender el precipitado lavado en solución salina con timerosal 1:10,000 hasta un volumen final de 100 ml.
- 6).- Tomar alícuotas de 10 ml y pasarlas a frascos vial estériles.
- 7).- Inoculación en animales (cuyes) siguiendo un esquema de inmunización adecuado.
- 8).- Obtención del suero inmune de cuyes y purificación del mismo.

OBTENCION DEL SUERO ANTI-AgsHB.

Este suero se obtuvo de cuyes sanos, los cuales fueron estimulados para la producción de anticuerpos anti-AgsHB, para lo cual se siguió el siguiente esquema de inmunización:

Inóculo A.- Mezcla de sueros positivos para AgsHB tratados con alumbre.

Inóculo B.- Mezcla de sueros positivos para AgsHB sin tratar.

Procedimiento: Inyectar por vía intramuscular 0.5 ml de inóculo A en cada extremidad posterior del cuy y repetir a las dos semanas. Seguir el siguiente calendario de inoculaciones (las inoculaciones intraperitoneales son con el inóculo B 0.5 ml cada vez).

Día	Inóculo- ml	Inoculación	Vía
0	A - 1ml	Primera	IM
14	A - 1ml	Segunda	IM
24	B - 0.5 ml	Tercera	IP
45	A - 1ml	Cuarta	IM
59	A - 1ml	Quinta	IM
69	B - 0.5 ml	Sexta	IP
79	-----	1er. sangrado de prueba	--
86	B - 0.5 ml	2do. sangrado e inoculación	IP
93	-----	3er. sangrado	--
100	B - 0.5 ml	4o. sangrado e inoculación	IP
107	-----	5o. sangrado	--
114	B - 0.5 ml	6o. sangrado e inoculación	IP

PURIFICACION DE GLOBULINA ANTI-AgsHB.

Precipitación con sulfato de amonio.

El procedimiento para el aislamiento de gammaglobulina sérica, incluye precipitación repetida con sulfato de amonio, a una concentración final de un tercio de saturación, Generalmente tres precipitaciones son suficientes para separar la gammaglobulina en forma bastante pura. Finalmente, las sales son removidas por diálisis.

Procedimiento:

1).- Ajustar el pH de la solución saturada de sulfato de amonio a pH 7.8 por adición de hidróxido de sodio 2 moles/litro.

2).- Con agitación constante, agregar lentamente (gota a gota), a un volumen de suero de 50 ml, un total de 25 ml de solución saturada de sulfato de amonio pH 7.8, logrando así un tercio de la saturación. En los primeros pasos, la adición de la solución de sulfato de amonio se realiza hasta que el precipitado de la adición previa se ha disuelto totalmente. Eventualmente, este precipitado persiste. Continuar la adición de la solución saturada de sulfato de amonio lentamente.

3).- Una vez realizada la adición total de la solución saturada de sulfato de amonio, continuar la agitación durante 2 - 3 horas adicionales para evitar que componentes séricos que no son gammaglobulina queden atrapados en forma mecánica dentro del precipitado.

4).- Centrifugar a 1400 g durante

30 minutos a temperatura ambiente. El primer precipitado contiene toda la gammaglobulina además de otras globulinas y trazas de albúmina.

5).- Disolver el precipitado en suficiente solución salina para restablecer el volumen original de la muestra de suero.

6).- Purificar la fracción de gammaglobulina por una segunda y tercera precipitación. Para la segunda precipitación repetir los pasos 1-5 y para la tercera precipitación repetir los pasos 1-4.

7).- Disolver el precipitado en solución salina amortiguada de boratos a un volumen final de la mitad o menor que el volumen original de suero.

8).- Remover el sulfato de amonio del precipitado por diálisis contra un amortiguador de boratos por varios días a 4°C, cambiando el dializante por la mañana y por la tarde. La diálisis se realiza a un pH ligeramente alcalino ya que la desnaturalización de las proteínas tiende a ocurrir a un pH de 7.

9).- Una vez que la diálisis es completa, retirar la solución de la bolsa de diálisis. Generalmente se forma algún material insoluble durante la diálisis. La solución final debe ser ligeramente opalescente. Centrifugar la solución a 1,400 g o más durante 30 minutos a 4°C.

10).- Analizar el producto para pureza y rendimiento de anticuerpo proteico por inmunolectroforesis

ESTABILIZACION DE LOS ERITROCITOS DE CARNERO.

Consiste en la fijación de eritrocitos de carnero con glutaraldehído, ya que se encontró que es superior a la fijación de eritrocitos con formalina. (46).

Procedimiento:

- 1).- Centrifugar a 2,000 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos la suspensión de eritrocitos frescos de carnero en Alsever.
- 2).- Descartar el sobrenadante y lavar el paquete celular tres veces con cloruro de sodio 0.15 Mol/litro.
- 3).- Descartar el sobrenadante del tercer lavado y enfriar el paquete celular a 4°C en un baño de hielo.
- 4).- Preparar una solución al 1% de glutaraldehído (25%) en la siguiente solución: un volumen de amortiguador de fosfatos 0.15 mol/litro pH 8.2; nueve volúmenes de cloruro de sodio 0.15 mol/litro, y cinco volúmenes de agua destilada. Enfríar esta solución a 4°C y utilizarla para diluir el paquete de eritrocitos al 1-2% (v/v).
- 5).- Incubar la mezcla de glutaraldehído y eritrocitos a 4°C durante 30 minutos con mezcla ocasional.
- 6).- Colectar las células fijadas por centrifugación a 2,000 rpm a temperatura ambiente.
- 7).- Descartar el sobrenadante y lavar el paquete celular cinco veces con cloruro de sodio 0.15 mol/li-

tro y cinco veces con agua destilada. El volumen de lavado será de un décimo del volumen total de la mezcla de reacción (glutaraldehído -eritrocitos).

8).- Suspender las células a una concentración final del 30% en agua destilada, adicionar timerosal a una concentración final de 1:10,000.

9).- Conservar la suspensión celular a 4°C, -20°C y -60°C en alícuotas.

SENSIBILIZACION DE LOS ERITROCITOS DE CARNERO.

Los eritrocitos de carnero frescos y preservados por glutaraldehído fueron sensibilizados por el método del ácido tánico (46, 47).

Procedimiento:

- 1).- Lavar las células preservadas por glutaraldehído cuatro veces con solución salina isotónica.
- 2).- Preparar una suspensión celular a una concentración final de 2.5% en solución salina isotónica.
- 3).- Mezclar un volumen de células estandarizadas al 2.5% con un volumen de ácido tánico diluido 1:2,000 en solución salina isotónica.
- 4).- Incubar la mezcla a 37°C durante 10 minutos. Centrifugar a 1,500 rpm durante 5 minutos.
- 5).0 Lavar el paquete celular con un volumen de amortiguador fosfato-salina 0.15 mol-litro pH 7.2 una sola vez y resuspender en el mismo amortiguador a una concentración final de 50%.
- 6).- Poner en contacto la suspensión celular al 50% con la concentración óptima de globulina (determinarla en cada caso) e incubar a 37°C durante un tiempo óptimo (según el caso).
- 7).- Centrifugar la suspensión celular a 2,000 rpm durante 5 minutos.
- 8).- Descartar el sobrenadante y lavar el paquete celular dos veces con cloruro de sodio 0.15 mol/litro y una vez con amortiguador fosfato-salina 0.15 mol/litro pH 7.2 con-

teniendo 0.25% de suero normal de cuy. El volumen de lavado será de la mitad del volumen de la mezcla de reacción.

9).- Resuspender el paquete celular en amortiguador de fosfatos-salina 0'15 mol/litro pH 7.2 conteniendo 0'25% de suero normal de cuy, a una concentración final de 1% (v/v). Adicionar timerosal a una concentración final de 1:10,000 como conservador.

10).- Guardar en refrigeración a 4°C.

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION REVERSA PASIVA.

El método de hemaglutinación reversa pasiva es una prueba particularmente rápida y sencilla con alta sensibilidad. Esta prueba está basada en el principio de que anticuerpos globulínicos latamente purificados obtenidos de suero de cuy anti-AgsHB, son fácilmente ligados a la superficie de eritrocitos de carnero, los cuales han sido tratados con ácido tánico, para dar una suspensión celular sensibilizada que alutinará en presencia del AgsHB.

Procedimiento:

- 1).- En una placa de microtitulación con fondo en U, colocar en cada pozo 0.025 ml de amortiguador de fosfato-salina 0.15 mol/litro pH 7.2 conteniendo 0.25% de suero normal de cuy con una pipeta calibrada.
- 2).- Tomar con un microdilutor 0.025 ml de suero problema e introducirlo en el primer pozo, logrando así una dilución 1:2, mezclar y pasar de aquí al segundo pozo, logrando una dilución 1:4 y así sucesivamente.
- 3).- Una vez realizadas las diluciones del suero problema o control positivo o negativo, enjuagar el microdilutor en una solución al 10% de formol, seguido de dos enjuagues más en agua destilada, y por último flamearlo al rojo vivo. Esto se hace después de cada uso con el fin de eliminar el AgsHB que queda en el microdilutor en caso de que exista, y evitar así una contaminación de los sueros restantes.

4).- Agregar a cada dilución 0.025 ml de eritrocitos de carnero sensibilizados, al 1%.

5).- Mezclar el contenido de los pozos por agitación suave de la placa.

6).- Cubrir las placas con película plástica (parafilm) y dejarlas en reposo a temperatura ambiente.

7).- Leer en la placa los patrones de sedimentación o hemaglutinación a la hora.

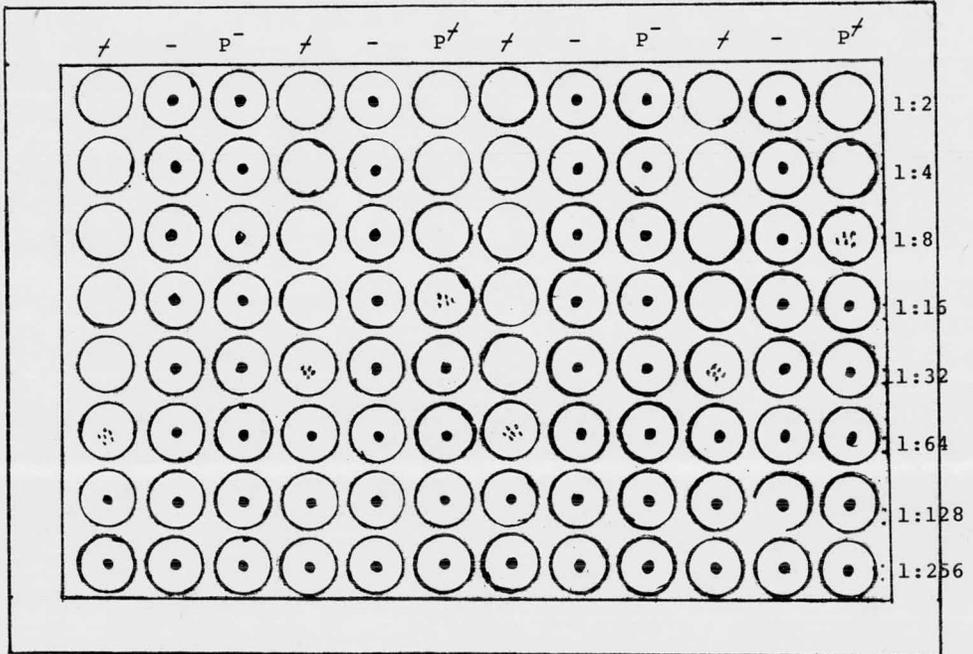
En cada placa debe correrse al menos un control positivo y un control negativo, para confirmación de las lecturas de los sueros problema.

La presencia de aglutinación en los pozos, implica que el suero es positivo para AgsHB.

La presencia de un botón bien definido en el fondo de los pozos, implica que el suero es negativo para AgsHB.

El título del suero positivo para AgsHB, será la máxima dilución del mismo que presente hemaglutinación total (ausencia de botón de eritrocitos en el fondo del pozo)
(35).

Esquema de una placa de microtitulación mostrando los patrones de aglutinación y sedimentación.



- + Control positivo para AgsHB.
- Control negativo para AgsHB'
- P⁺ Problema positivo para AgsHB.
- P⁻ Problema negativo para AgsHB.

CAPITULO V.

RESULTADOS.

I).- Fijación de eritrocitos.-

Se observó que el tratamiento de eritrocitos frescos de carnero con glutaraldehído en incubación a 4°C durante 30 minutos es suficiente para lograr la estabilización de los mismos, logrando así que el tiempo de duración y aprovechamiento se prolongue por largos períodos de tiempo.

Las células fijadas en glutaraldehído toman un color rojo claro inmediatamente después de la fijación volviéndose de color café gradualmente con los lavados sucesivos. El color final sin embargo es mas claro que el de la correspondiente suspensión de eritrocitos formalinizados.

Los eritrocitos de carnero fijados con glutaraldehído no se lisan cuando se suspenden en agua destilada. Resisten congelación y descongelación repetida, así como liofilización y su correspondiente reconstitución.

De las series de eritrocitos que fueron fijadas, se hicieron observaciones periódicas al microscopio, con el fin de detectar alguna alteración morfológica, lisis de los eritrocitos o bien alguna contaminación; sin embargo, ninguna de éstas se presentó hasta el momento de terminar éste trabajo.

Estos eritrocitos de carnero fijados con glutaraldehído conservaron su morfología sin ninguna alteración

así como su elasticidad y poder de captación (adsorción) de anticuerpos globulínicos anti-AgsHB por mas de seis meses.

En ningún momento se observó alteración macroscópica de la suspensión por lisis o contaminación.

Las alícuotas de estas series que fueron conservadas a -20°C y a -60°C , tampoco presentaron alteraciones morfológicas, lisis o contaminación; sin embargo, al ser descongeladas presentaron autoaglutinación; por lo que fue necesario someterlas a una agitación enérgica para lograr su total dispersión, para lo cual se utilizó un agitador Vortex.

Las células conservadas a -60°C presentaron un grado mayor de autoaglutinación, requiriendo por lo tanto mayor tiempo en agitación para lograr su dispersión total.

En algunas de las series conservadas a -60°C se observó macroscópicamente que en la superficie de la suspensión congelada, una porción de eritrocitos se encontraba seca, lo cual tal vez se debió a que el congelamiento ocurrió demasiado rápido sin dar lugar a que las células sedimentaran un poco para así quedar dentro del agua destilada utilizada para formar la suspensión, como ocurrió con otras series. Estas células secas se observaron al microscopio aglutinadas aún después de una agitación enérgica, en cualquiera de los casos, puede ser eliminada por filtración de la suspensión celular a través de varias capas de gasa, evitando así que al momento de ser utilizadas nos den reacciones falsas positivas.

II).- Sensibilización de eritrocitos de carnero fijados con glutaraldehído con anti-AgsHB:

Los eritrocitos de carnero fijados con glutaraldehído y conservados en refrigeración a 4°C o en congelación a -20°C ó -60°C, fueron recolectadas para ser sensibilizados de acuerdo a la técnica descrita.

La sensibilización se logró aún después de seis meses de almacenamiento en refrigeración o en congelación.

Para la sensibilización se utilizó tratamiento con ácido tánico 1:2,000 y globulina anti-AgsHB obtenida en cuy.

Una vez que los eritrocitos de carnero fueron tratados con el ácido tánico se procedió a su sensibilización (o recubrimiento) por incubación a 37°C con la globulina anti-AgsHB, para lo cual se efectuaron diferentes pruebas con el fin de determinar la concentración óptima de globulina anti-AgsHB, así como el tiempo óptimo de incubación con la misma. Para ello se utilizó un lote de 14 sueros positivos (A-N) al AgsHB por radioinmunoanálisis, tres de los cuales fueron negativos para el AgsHB por contrainmuno-electroforesis (C, D, y H), y cinco sueros negativos para el AgsHB por radioinmunoanálisis y contrainmuno-electroforesis (N_1-N_5), los que invariablemente dieron resultado negativo en la prueba de hemaglutinación reversa pasiva.

Los tiempos de incubación utilizados fueron: 20, 30, 45 y 60 minutos para cada concentración de globulina anti-AgsHB, según puede verse en las tablas I - IV.

Las concentraciones de globulina anti-AgsHB probadas fueron: 0.5 mg/ml; 0.25 mg/ml; 0.125 mg/ml; y 0.0625 mg/ml, realizándose de la siguiente manera:

Serie I.- Eritrocitos al 50%----- 0.2 ml.
 Globulina anti-AgsHB (1mg/ml) ----- 0.5 ml.
 Amortiguador fosfato-salina ----- 0.3 ml.
 pH 7.2 0.15 mol/litro.

Serie II.- Eritrocitos al 50% ----- 0.2 ml.
 Globulina anti-AgsHB (1 mg/ml)----- 0.25 ml.
 Amortiguador fosfatos-salina ----- 0.55 ml.
 pH 7.2 0.15 mol/litro.

Serie III.- Eritrocitos al 50% ----- 0.2 ml.
 Globulina anti-AgsHB (1 mg/ml) ----- 0.125 ml.
 Amortiguador fosfato-salina ----- 0.675 ml.
 pH 7.2 0.15 mol/litro.

Serie IV.- Eritrocitos al 50% ----- 0.2 ml.
 Globulina anti-AgsHB (1 mg/ml)----- 0.0625 ml.
 Amortiguador fosfato-salina ----- 0.7375 ml.
 pH 7.2 0.15 mol/litro.

De acuerdo con los resultados obtenidos, se llegó a la conclusión de que:

- Concentración óptima de globulina anti-AgsHB --- 0.125 mg/ml.
- Tiempo de incubación óptimo a 37°C ----- 30 minutos.

La sensibilización con globulina

anti-AgsHB se logra mejor y con mayor rapidez a 37°C que a temperatura ambiente, sin embargo, también se puede llevar a cabo a temperatura ambiente pero no se obtienen los mismos resultados y requiere de un tiempo mucho mayor.

Estos eritrocitos sensibilizados también pueden ser liofilizados, aumentando así el tiempo de conservación y sensibilidad, pero una vez reconstituídos deben ser utilizados dentro de las primeras horas siguientes.

La suspensión celular de eritrocitos sensibilizados al 1% con timerosal 1:10,000 como conservador se pueden conservar a 4°C, reteniendo su sensibilidad por varias semanas (cuatro por lo menos).

TABLA I.

TIEMPO DE INCUBACION VEINTE MINUTOS.

Suero	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
A	1:4	1:8	1:16	1:4
B	1:2	1:4	1:8	1:2
C	---	1:2	1:4	1:2
D	---	---	1:2	---
E	1:2	1:2	1:4	1:2
F	1:4	1:8	1:16	1:16
G	1:8	1:8	1:32	1:16
H	---	1:2	1:4	---
I	1:4	1:8	1:16	1:4
J	1:4	1:8	1:16	1:4
K	1:2	1:4	1:4	1:2
L	1:2	1:4	1:8	1:8
M	1:2	1:4	1:8	1:4
N	1:2	1:8	1:8	1:4
N ₁ -N ₅	---	---	---	---

Los títulos presentados corresponden a la mayor dilución que presentó hemaglutinación total por el método de hepaglutinación reversa pasiva.

TABLA II.

TIEMPO DE INCUBACION DE TREINTA MINUTOS.

Suero	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
A	1:8	1:8	1:16	1:8
B	1:4	1:4	1:8	1:2
C	1:2	1:4	1:8	1:4
D	---	1:2	1:4	---
E	1:2	1:4	1:8	1:2
F	1:4	1:8	1:32	1:16
G	1:8	1:16	1:64	1:32
H	---	1:2	1:4	1:2
I	1:8	1:8	1:16	1:4
J	1:8	1:16	1:32	1:16
K	1:4	1:8	1:8	1:4
L	1:2	1:8	1:16	1:8
M	1:4	1:8	1:16	1:16
N	1:4	1:16	1:16	1:8
N ₁ -N ₅	---	---	---	---

Los títulos presentados corresponden a la mayor dilución que presentó hemaglutinación total por el método de hemaglutinación reversa pasiva.

TABLA III.

TIEMPO DE INCUBACION CUARENTA Y CINCO MINUTOS.

Suero	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
A	1:8	1:8	1:16	1:8
B	1:4	1:4	1:8	1:2
C	1:2	1:4	1:8	1:4
D	---	1:2	1:4	---
E	1:2	1:4	1:8	1:1
F	1:4	1:8	1:32	1:16
G	1:8	1:16	1:64	1:16
H	---	1:2	1:4	1:2
I	1:8	1:8	1:16	1:4
J	1:8	1:16	1:32	1:16
K	1:4	1:4	1:8	1:4
L	1:2	1:8	1:16	1:8
M	1:4	1:8	1:16	1:16
N	1:4	1:16	1:16	1:8
N ₁ -N ₅	---	---	---	---

Los títulos presentados corresponden a la mayor dilución que presentó hemaglutinación total por el método de hemaglutinación reversa pasiva.

TABLA IV.

TIEMPO DE INCUBACION SESENTA MINUTOS.

Suero	Serie I	Serie II	Serie III	Serie IV
A	1:4	1:8	1:16	1:4
B	1:4	1:4	1:8	1:2
C	---	1:2	1:4	---
D	---	1:2	1:4	---
E	1:2	1:2	1:4	---
F	1:4	1:8	1:32	1:8
G	1:8	1:16	1:64	1:16
H	---	1:2	1:4	1:4
I	1:8	1:8	1:16	1:8
J	1:8	1:16	1:32	1:16
K	1:4	1:4	1:8	1:4
L	1:2	1:8	1:16	1:8
M	1:4	1:8	1:16	1:8
N	1:4	1:16	1:16	1:8
N ₁ -N ₅	---	---	---	---

Los títulos presentados corresponden a la mayor dilución que presentó hemaglutinación total por el método de hemaglutinación reversa pasiva.

III).- PRUEBA DE HEMAGLUTINACION REVERSA PASIVA:

Para realizar esta prueba se contó con un lote de catorce sueros positivos para AgsHB (A-N) por radioinmunoanálisis, tres de los cuales fueron negativos por contrainmunolectroforesis; un lote de cinco sueros negativos para AgsHB tanto por radioinmunoanálisis como por contrainmunolectroforesis, y con un lote de cien sueros problema que fueron probados en el laboratorio por contrainmunolectroforesis, con resultados negativos en su totalidad.

Al probar esas muestras de suero por hemaglutinación reversa pasiva, se obtuvo lo siguiente: de los catorce sueros positivos utilizados como control positivo, todos resultaron positivos, teniendo unos un título mayor que otros. Los sueros utilizados como controles negativos, también fueron negativos en su totalidad por esta técnica.

Sin embargo, de los cien sueros problema que fueron negativos por contrainmunolectroforesis, seis resultaron positivos por el método de hemaglutinación reversa pasiva mostrando buen título; en vista de ello, cuatro de esos seis sueros fueron probados por radioinmunoanálisis en el laboratorio de Medicina Nuclear (los otros dos no fueron probados por insuficiencia de muestra) y sólo dos de éstos resultaron positivos para AgsHB. Los sueros que resultaron negativos por radioinmunoanálisis y positivos por hemaglutinación reversa pasiva, es posible que se trate de dos reacciones "falsas positivas", pero también es posible que la explicación esté en un fenómeno relacionado con especificidad, pues se sabe que cier-

tas muestras negativas por el método considerado más sensible (RIA) dan resultados positivos aún con métodos de baja sensibilidad, lo cual excluye este factor como explicación de la discrepancia (45).

Los seis sueros que resultaron ser positivos por hemaglutinación reversa pasiva, fueron probados varias veces, (resultando positivos) e incluso se probaron con otra serie de eritrocitos fijados y sensibilizados de preparación reciente, obteniéndose los mismos resultados, con ligeras variaciones en el título de una prueba a otra, debido tal vez a error personal en la manipulación.

El tiempo de reposo de la placa de microtitulación generalmente fue de una hora, pero se realizaron observaciones a los 50 minutos, una hora, hora y media y dos horas, habitualmente no hay variación (y si existe es muy ligera, afinándose más los botones de eritrocitos sedimentados) en los patrones de sedimentación y aglutinación.

La placa debe estar en reposo absoluto lejos de cualquier vibración, pues ésta altera los patrones de sedimentación pudiendo dar lugar a falsas positivas.

Si un suero problema sólo da un título de 1:2, se aconseja repetirlo, pra descartar totalmente la presencia de una reacción falsa positiva.

CAPITULO VI.

RESUMEN.

A partir del descubrimiento del AgsHB por Blumberg y colaboradores, se ha desarrollado varias técnicas para la detección del AgsHB en suero humano.

Entre las técnicas desarrolladas, y en orden creciente de sensibilidad, se encuentran:

- Doble difusión en gel de agar.
- Aglutinación de partículas de látex.
- Contraelectroforesis.
- Reoforesis.
- Fijación de complemento.
- Hemaglutinación indirecta.
- Inhibición de la hemaglutinación.
- Hemaglutinación reversa pasiva.
- Radioinmunoanálisis.

Actualmente se reconoce que el radioinmunoanálisis es la técnica más sensible para la detección del AgsHB; no obstante, esta prueba no es accesible para todos los laboratorios ya que requiere de equipo especial, personal especializado, además del costo y el tiempo requerido.

En este trabajo se comprobaron las ventajas de la técnica de hemaglutinación reversa pasiva para la detección del AgsHB. Esta técnica sigue en sensibilidad al radioinmunoanálisis. Presenta como ventajas: menor complejidad en su manejo, sensibilidad relativamente alta, economía, rapidez, Esta téc-

nica puede ser montada como prueba de rutina para la detección del AgsHB en cualquier laboratorio que disponga de equipo de microtitulación y que esté en posibilidad de purificar globulina anti-AgsHB.

En éste trabajo se realizaron pruebas suficientes para determinar las condiciones óptimas para la realización de la técnica, como fue la determinación de la concentración y tiempo de incubación óptimos para la sensibilización de los eritrocitos de carnero utilizados. Además se obtuvieron en el laboratorio todos los reactivos necesarios para la prueba.

A pesar de que existen técnicas sumamente sensibles para la detección del AgsHB como radioinmunoanálisis y hemaglutinación reversa pasiva, ninguna técnica desarrollada hasta ahora nos da un 100% de detección del AgsHB.

CAPITULO VII.

CONCLUSIONES.

De acuerdo con las pruebas realizadas y los resultados obtenidos se concluye que:

- La fijación de eritrocitos con glutaraldehído es un buen método de estabilización y preservación de los mismos.

- La sensibilización (Adsorción de proteínas a la superficie celular) de eritrocitos se ve favorecida empleando un agente químico previo al contacto con la globulina, y se favorece a una temperatura de 37°C. En este trabajo fue posible confirmar el efecto del ácido tánico.

- La prueba de hemaglutinación reversa pasiva es lo suficientemente sensible para la detección del AgsHB aún cuando éste se encuentre en cantidades muy pequeñas en el suero humano. Presenta además considerable sencillez en su realización, además de ser una prueba rápida que no requiere la inactivación de los sueros.

- Si se preparan los reactivos en el laboratorio, también resulta ser una prueba económica.

- Aún se desconoce por qué algunos sueros positivos por un método resultan negativos por otros, a pesar de utilizar métodos de sensibilidad semejante o mayor.

CAPITULO VIII.

BIBLIOGRAFIA.

- 1).- Farreras - Rozman. Medicina interna. Tomo 1, octava edición Editorial Marín; 241 - 265, Barcelona, 1973.
- 2).- Gocke DJ: Hepatitis viral. Medicina de postgrado, 11-24, México, Feb. 1976.
- 3).- Gocke DJ: New faces of viral hepatitis. DM 1 - 32, Jan. 1973.
- 4).- British Medical Bulletin. Viral hepatitis. 28:2, 1972.
- 5).- Jawetz E: Manual de Microbiología Médica. Tercera edición, Ed. El Manual Moderno. 413-416, México, 1968.
- 6).- Fenner, FJ. Virología Médica. Ed. La Prensa Médica Mexicana. 362-369; México, 1970.
- 7).- Carfo A, Ruiloba J: Hepatitis infecciosa. Hígado y vías biliares. INN; 62-70, México, 1968.
- 8).- Blumberg BS: Australia antigen and the biology of hepatitis B. Science 197: 17, 1977.
- 9).- Gocke DJ: A prospective study of posttransfusion hepatitis. The role of Australia antigen. JAMA 219-9: 1165, Feb. 1972.
- 10).- Tripatzis I, Lubeck, Germany: Australia antigen in urine and feces. Amer J Dis Child: 123: 401, April 1972.
- 11).- Tripatzis I, Horst H: Detection of Australis-SH-antigen in urine. Nature 231: 266, 1971.
- 12).- Clackburn CW: The epidemiology of viral hepatitis in tropical countries. Amer J Dis Child 123: 345, April 1972.

- 13).- Prince AM: Prevalence of serum hepatitis related antigen (SH) in different geographic regions. *Amer J Trop Med Hyg* 19: 872, 1970.
- 14).- Mosley JW, Kendrick MA: Hepatitis a world problem. *Bull NY Acad Med* 45: 143, 1969.
- 15).- Blumberg BS, Alter HJ, Visnich S: A "new" antigen in leukemia sera. *JAMA* 191:545, 1965.
- 16).- Gerber MA, Hadziyannis S, Vernace S and Vissculis C: Incidence and cytoplasmic nature of the HBsAg in hepatocytes. *Lab Ser V A Hosp; Bronx NY Lab Invest* 32-2: 251, 1975.
- 17).- Howard CR and Zuckerman AJ: Characterization of the HBsAg polypeptides. *Hepat Res Unit London Sch Hyg Trop Med., London Intervirology* 4-1: 31, 1974.
- 18).- Cruceanu A, Babes VT, Popovici C: HBsAg.- Incidence of the subdeterminants "ad" and "ay" in blood donors. *Vox Sang* 28-5: 404, 1975.
- 19).- Committee on viral hepatitis, National Academy of Sciences: The implications in the public health of the presence of the HBsAg in human serum. *Morbidity and Mortality*, 21: lee, 1972.
- 20).- Popper H, Schaffner F: The vocabulary of chronic hepatitis. *N Engl J Med* 284: 1154, 1971.
- 21).- Frösner GG, Berg PA: Change in prevalent subtypes of HBsAg in acute hepatitis B infections and its implications. *International symposium on viral hepatitis. Develop Biol Satandard* 30: Dec. 1974.
- 22).- Feinman SV, Cocter N, Sinclair JC et al.: Clinical and epidemiological significance of the HBsAg: carrier state. *Gastroenterology* 68-1: 113, 1975.

- 23).- Senior JR: "Posttransfusion hepatitis". Gastroenterology 49: 315, 1965.
- 24).- Shimizu Y, Kitamoto O: "The incidence of viral hepatitis after blood transfusion". Gastroenterology 49: 740, 1965.
- 25).- Kissling RE and Baker LF: Evaluation of assay methods for hepatitis-associated antigen. Appl Microbiol 23-6: 1037, June, 1972.
- 26).- Alter HJ, Holland PV, Purcell RH: Counter-electrophoresis for detection of hepatitis-associated antigen: methodology and comparison with gel diffusion and complement fixation. J Lab Clin Med 77: 1000, 1971.
- 27).- Holper JC and Jambazian A: Comparative sensitivity of complement fixation, counter-electrophoresis and double diffusion for detection of Australia antigen. Transfusion (Philadelphia) 11: 157, 1971.
- 28).- Gocke DJ and Howe C: Rapid detection of Australia antigen by counter-electrophoresis. J Immunol 104: 1031, 1972.
- 29).- Schmidt NJ, Gee PS and Lennette EH: Relative sensitivity of gel diffusion, complement fixation and immunoelectrophoresis test for detection of hepatitis-associated antigen and antibody. Appl Microbiol 22: 165, 1971.
- 30).- Reesink HN, Boer JEG: Evaluation of different techniques for the demonstration of hepatitis B antigen. Develop Biol Standard 30: 88, 1975.
- 31).- Koehler H and Apodaca J: Demonstration of the HBsAg. A comparison of different serological methods. DTSCH Med WSCHR 100-11: 508, 1095 (Abstract).
- 32).- Reesink HW, Duimel NJ, Brummerluis HGJ: Evaluation of a

new hemagglutination test for HBsAg demonstration. Lancet 1351, Dec. 15, 1973.

- 33).- Finman SV, Kassnitzky O, Sinclair JC et al.: Prevalence and significance of the HBsAg in a general hospital. Canad Med Ass J 112-1: 43, 1975.
- 34).- Vandervelde EM, Mahmood N, Goffun C, Porter A, Meyson B, Co-sart YE: Guide for the use of some new tests for the HBsAg detection. Lancet, Nov 2, 1974.
- 35).- Ashcavai and Peters: Hemagglutination reverse pasive. Manual for hepatitis B antigen testing. WB Saunders Company, 1973.
- 36).- Campbell DH, Carvey J, Cremer N, Sussdorf DH: Passive hemagglutination. Methods in Immunology Pag 161-165, WA Benjamin Inc. New York 1964.
- 37).- Stavitsky AB: Micromethods for the study of proteins and antibodies; procedure and general applications of HA and HAI reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. J Immunol 72: 360, 1954.
- 38).- Zarco RM: Immunoaderence: its application for the detection of hepatitis-associated antigen in human serum. Blood Transfusion: 189, 1972.
- 39).- Wrihitt IG and Cayzae I: A rapid test of hemagglutination for HBsAg detection. Develop Biol Standard 30: 120, 1975.
- 40).- Cooksley WGE, Powell LW, Mistilis SP et al.: Hepatitis B-associated antigen and antibodies anti-HBsAg in chronic hepatitis and others hepatic diseases in Australia. Amer J Diag Dis 20-2: 110, 1975.
- 41).- Vyas GN, Mason MA, Williams EW: Detection of hepatitis B antigen and antibodies by hemagglutination assay. Blood

Transfusion: 137, 1972.

- 42).- Campbell D, Garvey J, Cremer N, Sussdorf D: Methods in immunology. Second edition WA Benjamin Inc. Pag 189-191, 270-292, London 1970.
- 43).- Prince AM, Brotman B, Ikram H: Hemagglutination assay: subtyping by hemagglutination, an ultrasensitive identity test for HB antigen. Bloor Transfusion: 147, 1972.
- 44).- Taylor PE: Present and future trends in the laboratory diagnosis of viral hepatitis. Develop biol standard 30: 43, 1975.
- 45).- Vandervelde EM: Selection of tests for hepatitis B antigen. Develop Biol Standard 30: 55, 1975.
- 46).- Bing DH, Weyand JGM, Stavitsky AB: Hemagglutination with aldehyde fixed erythrocytes for antigens and antibody assay. PSEBM 124: 1166, 1967.
- 47).- Daniel TN, Weyand JGM, Stavitsky AB: Micromethods for the study of proteins and antibodies. J Immunol 90: 741, 1963.

Esta Tesis se imprimió en Junio de 1978
empleando el sistema de reproducción Foto-Offset,
en los Talleres de Impresos Offsali-G, S. A., Av.
Colonia del Valle No. 535 (Esq. Adolfo Prieto),
Tels. 523-03-33 y 523-21-05 México 12, D. F



FACULTAD DE QUIMICA
BIBLIOTECA

fecha de devolución