UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

FRECUENCIA DE ANTIGENO AUSTRALIANO EN DONADORES DE SANGRE

(Presentación de 280 muestras de sangre trabajadas en el banco de sangre del Hospital San Juan de Dios Agosto 1985)

GLORIA MARINA LOPEZ PALMA DE TERRAZA

GUATEMALA, SEPTIEMBRE DE 1985

CONTENIDO

Pág.

TRODUCCION 1

FINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA..... 3

VISION BIBLIOGRAFICA 5

ATERIALES Y METODOS 17

SULTADOS..... 23

IALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS..... 25

NCLUSIONES 27

COMENDACIONES..... 29

SUMEN 31

FERENCIAS BIBLIOGRAFICAS 33

ENDICES..... 37

FRECUENCIA DE ANTIGENO AUSTRALIANO EN DONADORES DE SANGRE

I.
INTRODUCCION

En 1963 Blumberg describió por primera vez la existencia de un antígeno en la sangre de un aborigen australiano que denominó Antígeno Austrialia, el cual estaba asociado a la Hepatitis tipo "B" postransfusional. Años después de este descubrimiento se iniciaron estudios para ver si la detección de los portadores para este antígeno podría reducir la prevalencia de Hepatitis postransfusional tipo "B", hipótesis que fue comprobada por Gocke y colaboradores, quienes demostraron que de los recipientes que eran positivos para el HBsAg el 74o/o desarrollaban Hepatitis tipo "B" (5).

El riesgo de la hepatitis asociada con la transfusión de sangre procedente de donadores en otros países ha sido clara; donde demuestran que la incidencia en donadores de tipo comercial es de 4.1o/o y en la de tipo familiar es de 0.7o/o (6,26).

Con el fin de determinar la frecuencia de HBsAg en los donadores del banco de sangre del Hospital San Juan de Dios se recogieron las muestras de suero de los donadores que cumplieron con los requisitos establecidos en el banco de dicho Hospital (anexo 1).

En conjunto de los 280 sueros procesados por el método Elisa, ocho muestras fueron positivas para el Antígeno de Superficie de la Hepatitis "B" (HBsAg), o sea el 2.85o/o de los sueros. Obser-

vamos además que el donante de tipo comercial al igual que en otros países presentó una positividad mayor para el HBsAg, con una frecuencia del 2.5o/o y el tipo familiar 0.35o/o de positividad de los sueros.

II.
DEFINICION Y ANALISIS DEL PROBLEMA

Existen muchas evidencias históricas, epidemiológicas y experimentales sobre la diferencia antigénica que existe entre la hepatitis infecciosa y la hepatitis sérica,, encontrando actualmente un nuevo tipo, la No-A;No-B.

El virus de la Hepatitis "B" fue descrito por primera vez en el año de 1963, por Blumberg, como un componente sérico, que años más tarde se estableció como un índice específico de infección por el virus de la Hepatitis "B".

Estudios realizados sobre la detección del HBsAg han demostrado del 0.1o/o al 20o/o de portadores, en ciertas poblaciones, estableciéndose una relación mayor en los países cálidos, en hombres que en mujeres y en poblaciones urbanas que en las rurales. Los estudios serológicos han demostrado un aumento de anticuerpos con la edad, y una correlación inversa de esta frecuencia con factores socioeconómicos; las poblaciones con condiciones ambientales e higiénicas bajas, presentan mayor prevalencia de antígeno anticuerpo (4,16,17).

En los Estados Unidos se comunican unos 60,000 casos de hepatitis a los Centros del Control de Enfermedades Infecciosas, de ellos 18,000 se informan como Hepatitis tipo "B". De estos, 1 de cada mil sueros estudiados es positivo, mientras que en países de clima tropical y bajas condiciones económicas el porcentaje es mayor (8).

En Guatemala se han efectuado varios estudios sobre la frecuencia de este antígeno en poblaciones tanto sanas como enfermas estudios posteriores pusieron de manifiesto el virus, ya que hasta 1971 todos los estudios reportados fueron negativos: recordaremo que los estudios efectuados por Destarac en donadores de sangre por el método de contrainmunoelectroforesis encontró una incidencia del 0.2o/o.

En 1973 Blumberg trabajó en una población indígena a través de Radioinmunoensayo, reportando una incidencia del 3.8o/o. Maselli en 1974 toma una población también indígena de Pasac Xejuyup, Suchitepéquez, trabaja con contrainmunoelectroforesis encontrando un porcentaje de 23.5o/o.

En 1979 Casasola trabaja con pacientes con diagnóstico de Hepatitis Activa; usa dos métodos, el CEF y el IDR (Contrainmunoelectroforesis-Inmunodifusión) y reporta un 3.1o/o. En 1980 Valdés en un grupo de pacientes con diagnóstico de hepatitis y aquellos con riesgo de infección encuentra un 13.1o/o usando contrainmunoelectroforesis y HAPI (Hemaglutinación Pasiva Invertida).

Como podemos observar, de los datos anteriores podemos inferir que si bien es cierto que los trabajos iniciales demostraron una baja frecuencia en las poblaciones estudiadas y en las muestras aisladas, al utilizar métodos más sensibles y en este caso seleccionar los donadores de sangre, ya sea de tipo comercial o familiar, se encontró que la frecuencia de HBsAg en la muestra de población estudiada es alta, lo que nos conlleva a pensar que los problemas de hepatitis infecciosa, portadores sanos y la hepatitis crónica persistente con HBsAg positivo son muy frecuentes en Guatemala.

Hemos logrado hasta el momento tener un panorama general de esta situación; la misma nos conlleva al análisis y a la comprensión de la importancia de la determinación del HBsAg a todos los donadores de sangre en los diferentes bancos de sangre de los hospitales en nuestro país.

III.
REVISION BIBLIOGRAFICA

La determinación rutinaria de los diversos marcadores de virus de la hepatitis ha permitido clasificiar correctamente los cuadros clínicos de infección aguda viral. Así, actualmente, resulta relativamente sencillo el diagnóstico de hepatitis por virus A o B, además utilizando estos marcadores se ha concluído que existen otros virus capaces de producir hepatitis, distintos de A y B, y denominados No-A;No-B.

Según se ha comprobado por estudios de microscopía electrónica en biopsias humanas y de chimpances y en experimentos cruzados de inoculación con virus NANB, existen al menos dos tipos de virus NANB de transmisión parenteral. También se ha descrito otro virus NANB de transmisión fecal-oral, similar al virus A (8,15, 21,22,27).

Los tipos de hepatitis que se han descrito como causantes de hepatitis postransfusional son las hepatitis tipo "B" y las hepatitis No-A;No-B.

Antiguamente se consideraba que la hepatitis viral tipo "B" se transmitía únicamente por inoculación directa de sangre, en las últimas investigaciones se sabe de la existencia del antígeno de superficie de la hepatitis "B": en la saliva, leche materna, lágrimas, líquido vaginal, pleural, ascítico, en el semen, donadores de sangre, homosexuales, pacientes con desórdenes inmunológicos, transmisión madre-feto (6,19).

La hepatitis viral postransfusional tipo "B" es una infección generalizada o sistémica que afecta principalmente el hígado; donde produce una inflamación aguda o crónica, con un período de incubación que varía entre 60-120 días, el aspecto clínico de la enfermedad va desde la forma inaparente o asintomática, malestar leve, fiebre, desorden gastrointestinal, ictericia/o no; y en algunos pacientes infectados con el virus de la hepatitis B pueden presentar importantes

secuelas tardías, entre las que se incluyen: la hepatitis crónica activa, la cirrosis, la necrósis hepática masiva y el carcinoma hepatocelular (sobre éste último se está investigando al agente Delta, se conoce que necesita de la superficie del virus B para desarrollar enfermedad activa crónica en el hígado y carcinoma hepatocelular) (17,22).

Sabemos que no existen diferencias con respecto al sexo de los enfermos y el tipo de virus responsable de la enfermedad, la edad media de los pacientes con hepatitis por virus B (11-69 años) y en el virus No-A,No-B (25-69 años), respectivamente. Los climas cálidos están asociados con una mayor incidencia de hepatitis viral tipo B (5,16,21).

En estudios previos se ha demostrado que la persistencia a largo plazo del antígeno de superficie del VHB en el suero tiene una mayor incidencia en varones, y que la antigenemia persistente se correlaciona con una enfermedad hepática crónica debida a infección por VHB. Factores genéticos puede ser importante en cuanto a la aparición de un estado de portador crónico tras la infección por VHB (17).

Se ha argumentado que gran parte de la destrucción del parénquima hepático observado en la infección persistente por VHB es debida a una reacción inmunológica de tipo celular frente a los antígenos del VHB en el tejido, y que el grado de lesión hepatocelular podría ser minimizado mediante la represión de la respuesta inmune del huésped.

Para comprender las diferentes formas clínicas y morfológicas de la hepatitis B, no hay que olvidar que: el mismo virus de la hepatitis B no es citopatógeno, lo que explica la cronicidad, y sobre todo la existencia de portadores. Que las diferencias en las reacciones inmunológicas del huésped pueden dar lugar a una eliminación eficaz del virus o a una persistencia de la infección (1).

DESCRIPCION DE ANTIGENOS Y ANTICUERPOS DE VHB

HBsAg

Antígeno de superficie de la Hepatitis B.

Como antes se señaló, desde 1972 el antígeno Australia se denominó de superficie o HBsAg, ya que sus determinantes antigénicos están localizados en la cubierta externa del VHB. El HBsAg está constituido por el péptido p25 y la glicoproteína gp30 sintetizadas en el citoplasma del hepatocito. Las partículas esféricas, tubulares y de Dane que se observan con el microscopio electrónico en la infección por el virus de la hepatitis B tienen determinantes antigénicos del HBsAg en su superficie. Este antígeno posee cuatro subtipos principales: "adw", "ayw", "adr" y "ayr", con un determinante antigénico común "a" y dos mutuamente exclusivos "d"/"y" o "w"/"r". A su vez el determinante "a" está subdividido en otras subespecificidades "a1", "a2" y "a3", de modo que se reconocen 10 distintas categorías.

La determinación de los diversos subtipos mencionados sólo tiene interés epidemiológico, ya que permite identificar, por ejemplo, si una transfusión ha sido la responsable de un brote de hepatitis aguda, al comparar los subtipos de la sangre transfundida y del enfermo.

El antígeno de superficie se detecta muy precozmente a los 7 a 41 días de la inoculación y de 7 a 46 antes de la elevación de las transaminasas. Permanece positivo en la fase aguda de la enfermedad y desaparece de 1 a 13 semanas después del comienzo de los síntomas.

Cuando se mantiene la positividad más de 13 semanas puede indicar evolución a la cronicidad.

La presencia de HBsAg en dos muestras separadas entre sí 6 meses después indica estado de portador crónico del VHB.

Existen alrededor de 120-200 millones de portadores de HBsAg en el mundo. En España existe una prevalencia de 1.5o/o - 2o/o, en los E.E.U.U. un 5o/o (16,17).

AntiHBs

Frente al HBsAg se desarrolla un anticuerpo específico: el AntiHBs. Puede aparecer después de la negativización del HBsAg, aunque no siempre ocurre así y a veces no se detecta hasta varios meses después.

Durante esta fase la determinación del HBsAg y el AntiHBs no permite la infección por el VHB. El AntiHBs aparece muy precozmente en las hepatitis fulminantes, incluso a los 7 días de la infección.

La presencia del AntiHBs indica inmunidad frente a la infección por el VHB y por esto tiene un efecto protector.

El AntiHBs puede administrarse a las personas que tienen un contacto con el virus para bloquearle en la circulación periférica y evitar o atenuar la enfermedad clínica (inmunización pasiva). Para que sea eficaz debe administrarse en las 48 horas siguientes a la inoculación. Por otra parte se ha logrado desarrollar una vacuna frente al VHB mediante inactivación del mismo y que induce la producción del AntiHBs e inmunización (2,19,24,28).

HBcAg

El HBcAg representa la nucleocápside del VHB y su positividad significa infección activa y replicación viral. El core posee una estructura hexagonal con capsómeros y unas protuberancias de 7 a 10 nm. de longitud terminadas en una especie de "botón" (figura 1).

Es difícil determinar la presencia de HBcAg en suero ya que existe libre AntiHBc que interfiere con la reacción. Se ha conseguido detectar por radioinmunoensayo, tratando la partícula de Dane con detergentes, para liberar el HBcAg del núcleo del virus.

Se detecta en los primeros días de la infección aguda y en los portadore crónicos de HBsAg con alto nivel de replicación viral.

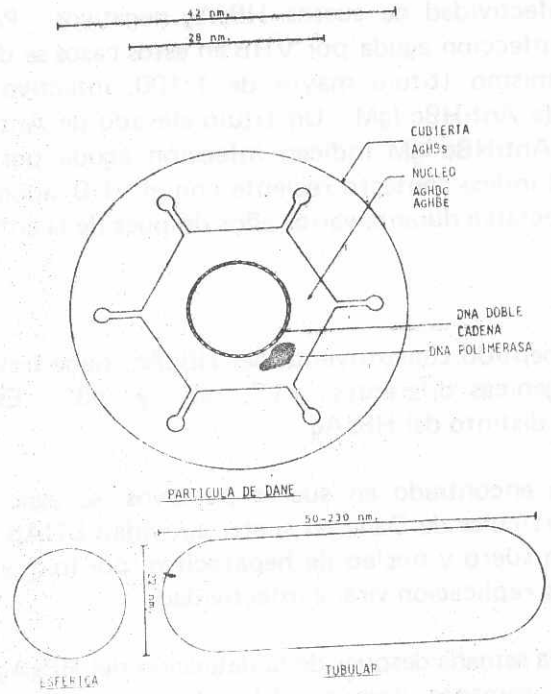

FIGURA 1: Partículas asociadas al virus B
(Fuente 18)

AntiHBc

El AntiHBc es distinto del AntiHBs y específico para el HBcAg, pero no tiene significado de protección, por este motivo la reexposición al VHB aumenta el título de AntiHBs, pero no el de AntiHBc.

Aparece en suero a los 2 ó 3 meses de la infección y puede permanecer detectable indefinidamente. Asociado a AntiHBs significa infección antigua resuelta en el momento de la determinación.

La presencia aislada de AntiHBc puede darse en el periodo "de ventana" de la hepatitis aguda; entre la negativización del HBsAg y la aparición del AntiHBs: puede indicar infección por VHB y así explicaría la infectividad de sueros HBsAg negativos. Para poder diagnosticar la infección aguda por VHB en estos casos se debe hacer titulación del mismo (título mayor de 1:100, infectivo), o bien determinación de AntiHBc IgM. Un título elevado de AntiHBc o la positividad de AntiHBc-IgM indican infección aguda por el VHB. El AntiHBc IgM indica contacto reciente con el VHB, aunque puede permanecer detectable durante varios años después de la enfermedad.

HBeAg

Es un polipéptido constituyente del HBcAg, tiene tres subespecificidades antigénicas diferentes "e1", "e2" y "e3". Es física y serológicamente distinto del HBsAg.

Sólo se ha encontrado en sueros positivos, se asocia con la existencia de partículas de Dane en suero, actividad DNAp y presencia de HBcAg en suero y núcleo de hepatocitos, por lo que se considera un índice de replicación viral e infectividad.

Aparece una semana después de la detección del HBsAg y puede negativarse tres semanas después del aclaramiento, persistiendo positivo en algunos casos de evolución a la cronicidad.

AntiHBe

Aparece a la cuarta semana del comienzo clínico en un 12,5o/o de los casos, se acompaña de presencia de DNAp y alto nivel de replicación viral.

El curso de la infección por el VHB, al negativizarse el HBsAg se positivan el AntiHBc y AntiHBe y posteriormente también el AntiHBs. Por lo tanto en la fase de convalescencia están presentes en suero simultáneamente y de una forma indefinida el AntiHBs o bien el AntiHBs, AntiHBc y AntiHBe.

El antecedente de hepatitis postranfusional en lugares donde como norma rutinaria se efectúa el HBsAg a los donadores de sangre es de 8o/o, sin embargo en otros países alcanza porcentajes elevados como del 40o/o (8,16,21,27,29).

HEPATITIS No-A,No-B

El descubrimiento de una proporción sustancial de hepatitis No-A/No-B tiene importancia clínica y sanitaria; conocemos de ésta la vía de transmisión que puede ser parenteral (postransfusional 40o/o). También se ha descrito otro virus NANB de transmisión fecal-oral, similar al virus A. Es necesario que el clínico se percate de la utilidad de las pruebas serológicas actuales para distinguir los tres tipos de hepatitis, la hepatitis crónica puede desarrollarse en las formas B y No-A/No-B.

En la hepatitis No-A/No-B los factores de riesgo conocidos: drogadicción (12o/o), las transfusiones (12-40o/o), el contacto previo con una persona infectada (12o/o), y las hospitalizaciones previas parecen ser un factor de riesgo para las hepatitis B y las No-A/No-B.

Se debe ser cauto en la interpretación epidemiológica de este tipo de hepatitis, se sabe que al igual que la hepatitis B, el agente o los agentes de la hepatitis No-A/No-B, provocan viremia crónica, por cuya causa es posible la transmisión percutánea mediante inyección de sangre o productos de ésta.

Llama la atención que la promiscuidad sexual de los varones homosexuales incrementan notablemente su riesgo de padecer la hepatitis A y B, no sufren la hepatitis No-A/No-B.

Por último, las hepatitis agudas No-A/No-B se diagnostican algunas veces por exclusión, es decir por ausencia de Anti-HAV, IgM y AntiHBc-IgM, también se descartan las infecciones por el virus de Epstein-Barr y citomegalovirus, por la negatividad de anticuerpos (8,14,15,20).

METODOS PARA LA DETECCION DEL HBsAg

La técnica de laboratorio usada en el descubrimiento de HBsAg fue la inmunodifusión (ID) por el método de Ouchterlony, modificado por Blumberg y Rindell (1963).

Inmunodifusión (ID)

INMUNODIFUSION o doble difusión en gel agar, identifica la reacción de anticuerpos y antígeno. Por ser un sistema de precipitación, existe un punto equivalente, donde las concentraciones de antígenos y anticuerpos producen una precipitación máxima de proteínas. Estas se llevan a cabo cuando las moléculas de antígeno están unidas entre sí por anticuerpos, formando así partículas grandes que no pueden permanecer en solusión. Es un método tan sensible como la inhibición de la hemaglutinación o radioinmunoensayo, por ser una prueba lenta que requiere 48 horas para completarse. La sensibilidad de la técnica puede incrementarse por preconcentración de la muestra, utilizando agarosa en lugar de agar, aumentando el contacto del reactivo por reforesis o evaporación controlada del buffer de la superficie o bien por inmunodifusión radia en el gel impregnado del anticuerpo.

Contrainmunoelectroforesis o contraelectroforesis (CEF)

Tiene la ventaja que tanto el HBsAg como su anticuerpo, poseen diferente movilidad electroforética en un campo eléctrico. Ello permite preparar una lámina con una capa de agarosa que contenga una serie de pozos perforados en el agar, de manera que cuando el antígeno y el anticuerpo están orientados apropiadamente en pozos opuestos y la placa es colocada en el campo eléctrico, migran uno hacia el otro, una reacción de precipitación visible del CEF ocurre en la zona entre los pozos en donde el antígeno y anticuerpo se unen. Las ventajas del CEF son dobles. Primero, es posible obtener una reacción positiva en 30-90 minutos de electroforesis y segundo, los reactivos se mueven en un sentido en lugar de difundirse radialmente del pozo, con lo que se tiene mayor sensibilidad.

La principal ventaja del método es el uso de una reacción que fija Ag-Ac que provoca que no se tomen en cuenta resultados falsos negativos debido al exceso de antígeno o anticuerpo.

Fijación de Complemento (FC)

Son frecuentemente más sensibles que la ID o CEF para la medición de HBsAg, pero menos sensibles que la hemaglutinación o radioinmunoensayo para la medición de AntiHBs. Este método cualitativo o cuantitativo puede completarse en dos horas, utilizando equipo sencillo y reactivos estandarizados. La única ventaja es que permite la detección del complejo Ag-Ac circulante en el suero del paciente. Dentro de las desventajas está la necesidad de reactivos estandarizados, el uso de más de una dilusión del suero para evitar el fenómeno de prozona y la posibilidad de una reacción anticomplementaria no específico en cierto suero.

Aglutinación de Partículas Inértes (API)

La detección de HBsAg utilizando partículas de látex cubiertas de AntiHBs preparado en animales, constituye un método simple y rápido de tamizaje. La prueba requiere poco equipo y corto tiempo, es de fácil interpretación y un poco más sensible que el CEF.

La prueba constituye una dilusión de la mezcla de HBsAg purificado con una suspensión acuosa de partículas finas de carbón. Este método es ocho veces más sensible que la ID y CEF. Este método además de ser sensible simple y rápido para la detección de HBsAg que involucra simultáneamente la aglutinación y floculación en presencia de partículas sintéticas de acrílico, cubiertas con fracciones de globulina de títulos elevados de AntiHBs producido por conejos hiperinmunizados.

Hemaglutinación Pasiva (HAP)
e Inhibición de la Hemaglutinación (IHA)

Provee un método sensible para la detección de AntiHBs. Se recubren eritrocitos con antígeno altamente purificado, usando cloruro crómico como agente acoplante que aglutina con cantidades muy pequeñas de anticuerpo y el resultado se obtiene en dos horas. Es unas 10,000 veces más sensible que la técnica de ID. Se observa aglutinación inespecífica a dilusiones bajas de suero y debe usarse control de eritrocitos. Se observan resultados falsos negativos debido a la formación de prozona, por lo que debe examinarse el suero a varias dilusiones. La sensibilidad del IHA es la misma que la CEF.

Hemaglutinación Pasiva Invertida (HAPI)

El AntiHBs recuperado purificado de componenetes Ag-Ac disociado, se fija a los eritrocitos fijados con formalina. Este método es muy simple y su sensibilidad se aproxima a la de RIA. La prueba es montada rápidamente y los resultados son de fácil lectura. Se dan una serie de reacciones falsas positivas inespecíficas que son inherentes al método, principalmente a causa de las aglutininas específicas de los eritrocitos, por lo que debe utilizarse un examen confirmatorio.

Radioinmunoensayo (RIA)

Este método combina la reacción específica Ag-Ac con la sensibilidad en la detección del radioisótopo. Esta técnica depende de la cuantificación de antígeno no enlazado al anticuerpo o anticuerpo no enlazado al antígeno, o de la extensión de la reacción Ag-Ac. El procedimiento más utilizado ha sido la introducción del isótopo Iodo en residuos de tirosina de péptidos.

El RIA es por lo menos 100 veces más sensible para la detección del antígeno y más de 21,000 veces más sensible para la detecci ón de anticueropos al compararse con métodos como ID o FC. Esta técnica permite la detección del HBsAg y AntiHBs en el mismo

suero; la estimación cuantitativa de HBsAg; la detección de HBsAg y AntiHBs en concentraciones muy bajas que no son detectables por otros métodos. Es el único método capaz de detectar complejos Ag-Ac en cantidades por debajo de la sensibilidad de otros métodos.

La desventaja principal del método es la lentitud para la obtención del resultado y el alto costo del equipo está sujeto a agotamiento, el mantenimiento es costoso y hay riesgo con el manipuleo de isótopos radioactivos.

Inmunoensayo Enzimático (fase sólida) -Elisa-

Wolters y colaboradores en 1976, describieron por primera vez el método Elisa; en la detección del HBsAg. Originalmente fue descrito por Enguall y Perlaman en 1972, para cuantificación de Ag-Ac.

El método se basa en el principio de radioalergosorbente RAST (descrito por primera vez en 1971), el cual enfrenta un antígeno en fase sólida con antisuero, después de eliminado el exceso de proteína se adiciona un conjugado ensimaantiinmunoglobulina absorbida por la fase sólida mide la cantidad de antígeno o anticuerpo específico en suero.

El antígeno se cuantifica por la actividad de la enzima frente a un sustrato específico manifiesta por un cromógeno. Los resultados se obtienen por lectura visual o por la espectofotométrica. La sensibilidad del método es comparable a la de RIA y superior a la de CEF.

Una ventaja sobre el método de RIA lo constituye el que no requiere equipo ni personal especializado, sus reactivos tienen un período largo de vida, lo que disminuye su costo. Además el tiempo de desarrollo de la técnica es relativamente corto por lo que puede utilizarse en gran escala.

IV.
MATERIAL Y METODOS

En el presente estudio se seleccionaron los donadores que asistieron al banco de sangre del Hospital General San Juan de Dios; de ambos sexos y edades comprendidas entre los 18-55 años, ya sea capitalinos o de los diferentes lugares de la república, las muestras fueron tomadas correlativamente y al azar, en el período del 1o al 21 de agosto del año en curso.

Correlativamente se tomaron 20 muestras al día, de aquellos donantes ya sea de tipo familiar o comercial que cumplían con las normas establecidas en el banco de sangre (anexo 1).

A los donantes seleccionados se les extrajo de las bolsas de sangre la cantidad de 5 cc. de sangre, la cual se centrifugó para preparar el suero de ella, las muestras se fueron guardando a una temperatura de $-20^{o}C$ hasta el momento de su análisis.

Se determinó el antígeno de superficie de la hepatitis "B", por el método Elisa de la casa Behring.

METODO

Colorimétrico Inmunoenzimático Elisa del Instituto Behring.

Juego de reactivos: .....(Hoecht)
Especímen: .....Suero
Longitud de onda: .....492 nm
Valores normales: .....Negativo

PRINCIPIO

El método utiliza el principio del emparedado en el cual el antígeno presente en el suero del paciente se una primero al anticuer-

po inmovilizado sobre la superficie interior de un tubo de plástico, después de lavar, en un segundo paso se hace reaccionar los determinantes antigénicos del antígeno unido que aun permanecen libres con un anticuerpo conjugado a la peroxidasa. El exceso de conjugado enzima-anticuerpo se remueve por lavado, y luego se determina la actividad enzimática en la fase sólida. La reacción entre el peróxido de hidrógeno y el cromógeno calolizado por la enzima es detenida por el agregado ácido sulfúrico diluido.

La intensidad del color es proporcional a la cantidad de HBsAg, presente en la muestra. La evaluación puede hacerse por comparación visual o fotométrica del color de las muestras contra los controles negativos y positivos.

MATERIALES

a) Recolección de la muestra:

Se utilizará suero fresco, si no se va a efectuar en el momento refrigerar a 2-8°C, para períodos mayores congelarla a −20°C.

b) Reactivos, su preparación y conservación:

Todos los reactivos se conservarán hasta la fecha de su caducidad entre 2° y 6° C.

1. Tubos con la pared interior revestida del anticuerpo AntiHBsAg, obtenidos de carnero. Una vez abierto el paquete, los tubos que no se usan se guardan en la misma bosla de aluminio con las tabletas de secantes y bien cierrado, así se mantienen sin alterar durante 4 semanas entre 4-6°C.

2. Conjugado AntiHBsAg/POD de conejo para diluir, agregar 10 ml del tampón-conjugado y mezclar bien evitando la formación de espuma, este preparado alcanza para 50 pruebas.

3. Tampón-conjugado para preparar el AntiHBsAg.

4. Control positivo: suero humano positivo para HBsAg: para monitorear la sensibilidad final de la prueba, diluirlo 1:10 con el suero control negativo.

5. Control negativo: suero humano negativo a HBsAg

6. Solusión concentrada de lavado POD, diluir 50 ml para hacer un volumen de 1,500 ml con agua destilada (alcanza para 50 pruebas); en el caso en que las pruebas sean menos, diluir proporcionalmente las cantidades necesarias, no guardarla.

PROCEDIMIENTO

1. Identificar convenientemente los tubos necesarios para la prueba de acuerdo al siguiente esquema:

1;2;3; y 4	Control negativo
5	Control positivo
6	Control positivo diluido 1:10
7	Suero del paciente X
8	Suero del paciente Y

2. Agregar 200 microlitros del suero control negativo a cada tubo de 1 al 4.

3. Agregar 200 microlitros de control positivo al tubo 5.

4. Agregar 200 microlitros del control positivo 1:10 con suero.

5. Agregar 200 microlitros del suero de cada paciente a su respectivo tubo.

6. Cubrir con papel adhesivo e incubar:

1.5	horas a 40°C (baño maría)
2.0	horas a 37°C (baño maría)
16-24	horas entre 18-25°C

7. Remover el papel adhesivo, aspirar el líquido y agregar aproximadamente 2 ml de solución lavadora, aspirar y repetir el lavado una vez más, luego aspirar para remover toda la solución de lavado.

8. Agregar 200 microlitros de solución de conjugado líquido comenzando por el tubo número 1, agregar esta solución con cuidado de no mojar las paredes del tubo.

9. Cubrir con papel adhesivo nuevo o incubar en baño de agua; una hora a 40°C ó 1.5 horas a 37°C.

10. Poco antes de finalizar la incubación preparar el cromógeno, agregándole 10 ml de la solución tampón-sustrato, a un vial de cromógeno y disolver por agitación, alcanza para 45 pruebas (protegerlo de la luz).

11. Quitar el papel adhesivo, aspirar y lavar 4 veces como se describe antes, aspirando todo el contenido al final.

12. Agregar 200 microlitros del cromógeno preparado a cada tubo.

13. Cubrir con nuevo papel adhesivo e incubar 30 - 2 minutos a temperatura ambiente y en la obscuridad.

14. Quitar el papel y agregar 1.0 ml de solución detenedora, con el mismo intervalo de tiempo con que se agregó el cromógeno.

15. Evaluar los resultados antes de una hora.

EVALUACION

a) Visual: colocar los tubos sobre una superficie blanca para observar cambios de color. El control positivo tendrá un color amarillo-naranja. El control negativo es incoloro. Toda muestra con cambio de coloración a amarillo-naranja será positiva.

b) Fotométrica: poner el cero con agua destilada, hacer la lectura de absorvencias de los controles negativos y positivos para conocer los rangos de cada uno y poder clasificar la muestra de ellos, o sea que todo valor mayor o igual al promedio de los controles negativos es Negativo.

V.
RESULTADOS

Cuadro No. 1
RELACION TIPO DE DONANTE, ANTIGENO DE SUPERFICIE VIRUS HEPATITIS "B"

HBsAg	VOLUNTARIO	COMERCIAL
POSITIVO	1 (00.35o/o)	7 (2.50o/o)
NEGATIVO	72 (25.71o/o)	200 (71.42o/o)
TOTAL	73 (26.06o/o)	207 (73.92o/o)

FUENTE: Libros de Registro del Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios.

Cuadro No. 2
RELACION SEXO, ANTIGENO DE SUPERFICIE VIRUS HEPATITIS "B"

SEXO	POSITIVO	NEGATIVO	o/o
MASCULINO	7	242	2.5
FEMENINO	1	30	0.3
TOTAL	8	272	2.8

FUENTE: Libros de Registro del Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios.

Cuadro No. 3
RELACION EDAD-SEXO EN LOS DONADORES,
HBsAg VIRUS HEPATITIS "B"

SEXO	EDAD				
	18-25	26-35	36-45	46-55	Totales
FEMENINO	13	12	6	0	31
MASCULINO	116	86	40	7	249
Subtotal	129	98	46	7	280

FUENTE: Libros de Registro del Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios.

Cuadro No. 4
RELACION EDAD-ANTIGENO DE SUPERFICIE
VIRUS HEPATITIS "B"

HBsAg	EDAD				
	18-25	26-35	36-45	46-55	Totales
POSITIVO	4	4	0	0	8
NEGATIVO	125	94	46	7	272
Subtotal	129	98	46	7	280

FUENTE: Libros de Registro del Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios.

VI.
ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente estudio encontramos que de los 280 sueros de donadores, tanto comerciales como familiares, se obtuvo ocho muestras positivas para el HBsAg, lo que hace un porcentaje del 2.85o/o del total de las muestras; a comparación de los estudios realizados en la década de los 70 en nuestro país; observamos a través de los estudios de Pineda (1971), con una población de donadores (300), utilizando CEF; reportó 0 casos para el HBsAg. En el mismo año Destarac trabajando siempre en donadores (8,000) con el método CEF encuentra un porcentaje de 0.02o/o de HBsAg. En 1979 con el método HAPI en una población de 200 donadores reportan una frecuencia del 3.0o/o.

En otros países la frecuencia para el HBsAg en donadores familiares la encontramos en un 0.7o/o-4.1o/o, respectivamente.

Como podemos observar, hay una gran diferencia en números al revisar los porcentajes y considero que la misma se debe a que actualmente contamos con métodos altamente sensibles y específicos, los de tercera generación en fase sólida como lo son el RIA y ELISA.

En el cuadro No. 1 encontramos la relación tipo de donante antígeno de superficie del virus de la hepatitis tipo "B"; de los 280 sueros procesados se presentaron 73 de tipo familiar y 207 de tipo comercial, este dato es similar al reportado en la literatura revisada: de estos 73 sueros de donantes tipo familiar o voluntario observamos que se presentó una frecuencia para el antígeno de superficie del 0.35o/o, o sea un caso fue positivo; en otros estudios fuera del país reportan 0.7o/o. En los donantes de tipo comercial de un total de 207; encontramos de estos 7 sueros positivos que hacen un porcentaje del 2.5o/o (otros 4.1o/o), a través de estos números podemos deducir que la frecuencia del HBsAg en este estudio es alta; sobre todo en aquellos donadores de tipo comercial.

Analizamos, además, la importancia de la detección del Antígeno de superficie del virus de la Hepatitis tipo "B", en este tipo de donadores (comercial y familiar); ya que hasta el momento no se efectúa en nuestro país, está reportado en otros lugares que mediante las medidas de control sanitario; la frecuencia de HBsAg en los donadores tiende a disminuir; reportando que solamente el 8o/o de las Hepatitis tipo "B", fueron adquiridas por vía transfusional, debiendo este descenso a la introducción de la determinación del HBsAg en los bancos de sangre (21).

El sexo que con mayor frecuencia dona su sangre es el masculino, tanto en nuestro país como en otras partes del mundo, sabemos que en la literatura se ha reportado que la persistencia del HBsAg en los varones es mayor, alcanzando porcentajes del 5-10o/o (17).

De las 249 muestras de varones procesadas: 7 de ellas fueron positivas, lo que hace un porcentaje del 2.5o/o; y en el sexo femenino de las 31 donantes 1 suero fue positivo, o sea el 0.3 o/o de los sueros (cuadro No. 2).

La mayor positividad para el HBsAg se presentó en las edades correspondientes de 18-35 años, resultados que concuerdan con los trabajos presentados anteriormente en nuestro país por Pineda y Destarac (3,4,5,6,26) (cuadro No. 3).

Otro dato importante que encontramos en la literatura en donde nos indican que la persistencia del HBsAg en la población adulta es del 14o/o; este dato tiene mucha relación con este estudio, ya que de las 227 muestras de suero de los donantes comprendidos entre los 18-35 años, ocho fueron positivas, lo que para este rubro hace un porcentaje del 1.42o/o, sabiendo que de estos muchos tendrán persistencia para el antígeno de superficie (cuadro No. 4).

VII.
CONCLUSIONES

1— Del total de 280 muestras procesadas por el método Elisa, ocho sueros fueron positivos, lo que corresponde al 2.85o/o, considerando que es un porcentaje alto para las muestras estudiadas.

2— Pudimos observar que la frecuencia del portador sano del HBsAg en este estudio, lo encontramos en el donante de tipo comercial o remunerador, ya que de los 280 donantes 2.49o/o fueron de tipo comercial, presentaron 7 casos positivos con un porcentaje del 2.5o/o.

3— La detección de los portadores sanos del virus de la Hepatitis se hace mayor si para ello se utilizan métodos con alta sensibilidad y especificidad, como los de tercera generación o fase sólida (RIA y Elisa).

4— En nuestro país constituye una urgente necesidad el establecimiento de control de transmisión de la Hepatitis B postransfusional mediante la determinación del HBsAg en los bancos de sangre, ya que no se hace actualmente.

5— Existe el grupo de individuos en contacto constante o profesional con pacientes susceptibles (técnicos de laboratorio, banco de sangre, personal médico y paramédico), este grupo de trabajadores es un grupo de riesgo que debe controlarse con mayor cuidado y efectuársele estudios periódicos para la detección del virus de la Hepatitis B postransfusional.

6— Por los hallazgos del presente trabajo podemos recomendar la prueba Elisa como norma para la detección del virus de la hepatitis B, ya que la prueba es comparable en sensibilidad y especificidad a la de RIA, según la literatura revisada.

VIII.
RECOMENDACIONES

1— Establecer, como norma en los bancos de sangre, técnicas para la detección del antígeno de la Hepatitis "B". En los donadores, ya sea de tipo familiar o comercial.

2— Desechar todas las bolsas de sangre de los donadores que sean positivos para el virus de la Hepatitis B, en esta manera disminuir la frecuencia de hepatitis tipo "B" postransfusional.

3— Detectar todos aquellos donantes portadores sanos del virus de la hepatitis tipo "B" y sus posibles contactos hospitalizados en este centro (Hospital San Juan de Dios), para que a estos últimos se les efectúen pruebas para determinar el HBsAg intrahospitalariamente.

4— Es necesario que a nivel de servicios de salud exista un mejor control de portadores, donadores y condiciones higiénicas en nuestro país, para evitar la transmisión de esta enfermedad.

5— Se recomienda hacer un estudio epidemiológico y de laboratorio a nivel nacional en todos los hospitales que tengan banco de sangre, para tener una visión global y real de lo que el problema (Hepatitis B postransfusional) representa actualmente en el país.

6— Según la literatura, sabemos que el método Elisa es igual o comparable al RIA en sensibilidad y especificidad, y por lo tanto lo recomendamos a los bancos de sangre y en posteriores estudios.

IX.
RESUMEN

El presente trabajo tuvo como fin la determinación de la frecuencia del Antígeno de superficie en los donadores de sangre, del banco del Hospital General San Juan de Dios, a través del método Elisa.

Se estudiaron 280 sueros provenientes de los donadores, ya sea de tipo comercial o familiar que acuden a dicho banco de sangre, los mismos comprendidos entre las edades de 18-55 años de ambos sexos y residentes en diferentes lugares de la república.

Para su estudio, dichos sueros fueron clasificados según las reglas del banco de sangre y ellas consisten en no aceptar ningún suero positivo (reaginina), no haber donado sangre 6 meses antes, no haber estado en contacto con enfermos con hepatitis, ni padecer de la misma en la actualidad, tener un hematocrito arriba de 38 para el sexo femenino y arriba de 40 para el masculino (otros, ver anexo 1).

Se determinó la presencia de HBsAg a través del método de inmunoensayoenzimático de fase sólida (Elisa), los resultados del estudio mostraron la presencia del HBsAg en 8 sueros, lo que representó un 2.85o/o de los sueros procesados, además demostró que es el donante de tipo comercial que al igual que en otros países ocupa el primer lugar en seropositividad un 2.5o/o, no así el de tipo familiar ya que presentó un 0.35o/o de las muestras.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

I. Bianchi,L. et al. Hepatitis crónica B relaciones entre el virus hepático y la respuesta inmunitaria Rev Clin Esp I979 Jun 8; I52(6):439-444

2. Blumberg,B. et al. Ted slavins blood and the developmet of HBV vaccine N Eng J Med I985 Jan I7; 3I2(3):I89

3. Cáceres,Armando. et al. Diagnóstico inmunológico de infección po el virus de la hepatitis B en pacientes susceptibles guatemal tecos.Revista del Colegio Médico (Guatemala) I985 Sep; 2:7-I

4. Cardona,S. Análisis epidemiológico de hepatitis viral tipo B en Guatemala. Tesis (Médico y Cirujano)-Universidad de San Car - los, Facultad de Ciencias Médicas. Guatemala, I982. 33p.

5. Casasola,Lucrecia. Infección por el virus de la hepatitis B en Guatemala. Tesis (Química-Farmacia)-Universidad de San Carlos Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, I979. 50p.

6. Castillo,Graciela. Diagnóstico de la hepatitis B por la detecci del HBsAg por el método Elisa. Tesis (Químicas-Farmacia)-Uni- versidad de San Carlos, Facultad de Ciencias Químicas y Far - macia. Guatemala, I980. 50p.

7. Coulepsis,L. et al. Detection of hepatitis A virus in the feces With naturaly acquired infections. Infect DIS I980 Feb; I42 645-659

8. Donald,P. et al. Incidencia de la hepatitis A,B y no-A;no-B en Estados Unidos. Am J Med (Español) I984 Ene; I9(I):4I-47

9. Drueke,T. et al. Periarteritis nodosa asociada al antígeno de l hepatitis B en pacientes en hemodiálisis crónica. Am J Med (pañol) I980 Ene; II(I):39-43

IO. Garcia,G. et al. Alteraciones inmunológicas humorales en el cur evolutivo de las hepatopatías agudas y crónicas. Rev Clin Es I980 Abr; I59(3):2I7-2I9

II. Gil,R. et al. Anemia hemolítica autoinmune en un enfermo crónic mente infectado por el virus de la hepatitis B. Rev Clin Es I980 Nov; I42(4):327-332

I2. Goodman,R. et al. Transmisión hospitalaria de la hepatitis A p una paciente adulta con diarrea. Am J Med(Español) I982 Agos I6(2):I07-III

I3. Hoofnagle,J. Serologic markers of hepatitis B virus infection. J Med I98I Mar; 3(2):I-IO

Universidad de San Carlos de Guatemala
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
OPCA — UNIDAD DE DOCUMENTACION

Kane,M. et al. Epidemic non-A,non-B hepatitis in Nepal. JAMA I984 Dec I4; 242(22):3I40-3I45

Khuroo,M. Estudio sobre una epidemia de hepatitis no-A, no-B; posibilidad de otro virus de la hepatitis humana distinto del tipo postransfusional no-A,no-B. Am J Med (Español) I980 Jun; II(6):387-392

Littenberg,A. et al. Vacunación de la hepatitis B tres estrategias de de isión para el individuo. Am J Med (Español) I984 Dec; 20(6):34-36

Monte,S. de la. et al. Factores de riesgo en la aparición de complicaciones letales debidas a la infección por el virus de la hepatitis B en el hombre. Am J Med (Español) I984 Sep 3; 20(3):I89-I93

Mora,I. et al. Marcadores serológicos del virus de la hepatitis B. Rev Clin Esp I984 Abr I2; I73(I):9-I3

Moriaty,Ann. et al. Antiboides to peptides detec new hepatitis B a tigen. Science I985 Jan 25; 24(227):429-432

Polesky,H. et al. No-A;no-B, hepatitis and intravenous inmunoglobu lin. Lancet I985 Jan 5; I(84I9):5I

Porres,J. et al. Estudio prospectivo de las hepatitis agudas por rus A,B.y no-A,no-B. Rev Clin Esp I976 Nov 7; I42(4):3I-33

Raimondo,G. et al. Delta infection in hepatocelular carcinoma pos tive for hepatitis B surface antigen. Ann Intern Med I984 Jun; IOI(4):343-344

Rose,S. et al. The risk of AIDS affter hepatitis vaccination JAM I985 May 24; 253(20):2960

Tabor,E. et al. Specificity of test for antibody to hepatitis B face antigen in patients. Ann Intern Med I984 Oct; IOI(4):27

Tabor,E. et al. Antiboides to hepatitis and B virus antigen in P (D) inmuneglobulin. Lancet I985 Jan 5; I(84I9):46

Valdés,O. Investigación de HBsAg en pacientes con desordenes inm lógicos. Tesis(Químicas-Farmacia)-Universidad de San Carlos, cultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Guatemala, I980. 27

Werner,D. et al. Seroconversion rates whit hepatitis B vaccine. Intern Med I984 Oct; IOI(4):254

Universidad de San Carlos de Guatemala
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
OPCA — UNIDAD DE DOCUMENTACIÓN

28. Wildhire,E. et al. Forma evolutiva especial de la hepatitis crónica persistente. Rev Clin Esp I979 Jun; I52(6):432-436

29. Zeldis,J. et al. Anemia aplástica y hepatitis No-A,No-B. Am J Med (Español) I983 Ene; I7(I):36-39

Vo Bo

Universidad de San Carlos de Guatemala
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
OPCA — UNIDAD DE DOCUMENTACION

EXAMEN PERIODICO

	1	2	3	4		1	2	3	4
[illegible]HA					No. Embarazos				
[illegible]M.A					Producto E.H.R.N.				
[illegible]A.					Vacunación				
[illegible]MP.					Transfusión				
D[illegible]ETES					Cabeza				
S[illegible]LIS					Torax				
H[illegible]TITIS					Bazo				
T B					Hígado				
Convul[illegible]ONES					Tatuajes				
Drogas					Venas				
Paludismo					Piel				

STINADA[illegible] 1. _____ 2. _____

3. _____ 4 _____

EXAMEN PERIODICO

	1	2	3	4		1	2	3	4
[illegible]HA					No. Embarazos				
[illegible]M.A					Producto E.H.R.N.				
[illegible]A.					Vacunación				
[illegible]MP.					Transfusión				
D[illegible]ETES					Cabeza				
S[illegible]LIS					Torax				
H[illegible]TITIS					Bazo				
T B					Hígado				
Convul[illegible]ONES					Tatuajes				
Drogas					Venas				
Paludismo					Piel				

STINADA[illegible] 1. _____ 2. _____

3.

CENTRO DE INVESTIGACIONES DE LAS CIENCIAS

DE LA SALUD

(C I C S)

CONFORME:

Dr.

ASESOR.

Julio Enrique Cáceres Z.
MEDICO Y CIRUJANO
COLEGIADO 2233

SATISFECHO:

Dr.

REVISOR.

Dr. Julio R. Cabrera V.
MEDICO Y CIRUJANO
Colegiado 2007

APROBADO:

DIRECTOR DEL CICS

IMPRIMASE:

Dr. Mario René Moreno Cámbara
DECANO
FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS.
U S A C.

Guatemala, 14 de octubre de 1985

Los conceptos expresados en este trabajo
son responsabilidad únicamente del Autor.
(Reglamento de Tesis, Artículo 44).