



TESIS DOCTORAL

Purificación del antígeno HB (Australia) y estudio de la respuesta inmunológica frente al mismo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Emilio Gómez de la Concha

DIRECTOR:

A. Merchante

Madrid, 2015

DE 578/891
GOM



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5312159179

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

Facultad de Medicina

M A D R I D

7A 1974

PURIFICACION DEL ANTIGENO HB (AUSTRALIA)

=====

Y ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA

=====

FRENTE AL MISMO.

=====

Trabajo realizado por D. Emilio
Gómez de la Concha para optar -
al grado de Doctor.

Director: Prof. A. Merchante.

I N D I C E.-
=====

	<u>Pág.</u>
I - <u>INTRODUCCION</u> =====	1-29
I-1) Terminología	5
I-2) Características físico-químicas	6
I-3) Método de purificación	10
I-4) Criterios de pureza	12
I-5) Morfología	13
I-6) Virus de la hepatitis B	15
I-7) Subtipos	17
I-8) Métodos para detectar Ag y Ac.HB....	19
I-9) Epidemiología de la hepatitis B	24
II - <u>OBJETIVOS</u> =====	30-35
III- <u>PURIFICACION DEL ANTIGENO HB.</u> =====	36-53
III-1) Materiales y métodos	36
III-2) Resultados	43
III-3) Discusión	51
IV - <u>ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA FRENTE</u> =====	
<u>AL ANTIGENO HB.</u> =====	54-159
IV-1) <u>Materiales y Métodos.</u>	
IV-1-1) Personas estudiadas	54
IV-1-2) Determinación de anticuerpos HB	60

	<u>Pág</u>
IV-1-3) Determinación de antígeno HB	66
IV-1-4) Estudio de la clase de anticuerpos HB	68
IV-1-5-) Estudio de la inmunidad celular ..	69
IV-2) <u>Resultados</u>	
IV-2-1) Determinación de antígeno y anti cuerpos HB	77
IV-2-2) Relación entre presencia de anti cuerpos HB e infección por el vi rus de la hepatitis B.	114
IV-2-3) Estudio de la clase de Anticuer pos HB.....	115
IV-2-4) Inmunidad celular	118
IV-2-5) Resistencia del antígeno HB al - calentamiento	122
IV-3) <u>Discusión.</u>	
IV-3-1) Test de hemaglutinación pasiva..	124
IV-3-2) Significación de los anticuerpos HB.....	126
IV-3-3) Transmisibilidad de la hepatitis B; Incidencia de antígeno y anti cuerpos HB.....	128
IV-3-4) Clase de inmunoglobulina a la -- que pertenecen los anticuerpos..	139
IV-3-5) Papel de los mecanismos inmunoló gicos en la protección frente a la hepatitis B.....	141
IV-3-6) Papel de los mecanismos inmunoló gicos en la evolución de la hepa titis B.....	148
IV-3-7) Anticuerpos contra el núcleo cen tral de la partícula de Dane....	157
V - <u>CONCLUSIONES.</u>	160-166
VI- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	167-189

Esta tesis ha sido realizada en el Servicio de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz. Quiero expresar mi profundo agradecimiento a su Jefe, el Dr. Ortíz Masllorens. Su gran personalidad dentro de la Inmunología y su profundo dominio de la misma, han sido los que han despertado mi vocación por esta rama de la Medicina. A él le debo mis conocimientos sobre el tema, y de él partió la idea original de este trabajo.

Mi sincero agradecimiento también al Prof. D. Alfonso Merchante Iglesias, Director de esta tesis. De las enseñanzas magistrales de D. Carlos Jiménez Díaz y de él mismo he obtenido durante mis años de estudiante en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense mi formación en Medicina Interna, que he procurado completar en años sucesivos.

Debo asimismo expresar mi agradecimiento a la Fundación Jiménez Díaz y muy especialmente a su Director, el Prof. D. Eloy López García, por los medios puestos a mi disposición. Sin el espíritu de colaboración existente en ella

no hubiera sido posible la realización de este trabajo. -
Mi gratitud a todos aquellos que en alguna forma han con-
tribuido al mismo, en particular a los servicios de Gastro-
enterología, Nefrología, Medicina Interna, Anatomía Patoló-
gica y Hematología, y a todos mis compañeros del Servicio
de Inmunología.

I - INTRODUCCION
=====

En 1961 Allison y Blumberg comenzaron un estudio sistemático del suero de enfermos transfundidos para tratar de descubrir nuevos sistemas polimórficos. Pensaban que estos enfermos habrían desarrollado anticuerpos contra proteínas presentes en la sangre recibida y que ellos habrían heredado o adquirido previamente. Para ello utilizaron el método de doble difusión en gel de agar (técnica de Ouchterlony) poniendo el suero de los sujetos transfundidos en el pocillo central y el panel de sueros probados en los pocillos periféricos.

Dado que los polimorfismos humanos varían enormemente en su frecuencia según las poblaciones, utilizaron sueros de sujetos de lugares muy diversos. Pronto encontraron que el suero de un paciente transfundido (C. de B.) contenía un anticuerpo precipitante que reaccionaba con algunos de los sueros frente a los cuales fué probado. Comprobaron que este antisuero definía un sistema de especificidades antigénicas en las beta-lipoproteínas (Blumberg y cols. 1964). Este fué designado sistema Ag y desde entonces se han descrito una serie compleja de especificidades en él.

Esto estimuló la búsqueda de nuevos sistemas y así -- en 1963 vieron la aparición de una línea de precipitación al reaccionar la sangre de un enfermo con hemofilia con un solo suero de los 24 frente a los que fué probado. Este suero era de un aborígen australiano (Blumberg, 1964), por lo

que siguiendo una práctica común en genética humana utilizaron un término geográfico "Antígeno Australia" (Au (1)) para su denominación. Apoyaba el que esto fuera una reacción antígeno-anticuerpo: 1) Que entonces sólo se encontró el -- "anticuerpo" en enfermos politransfundidos.

2) Que se vió que lo que reaccionaba - de estos sueros era una Ig G.

3) Que si se inmunizaba a conejos con suero conteniendo Au (1) desarrollaban anticuerpos específicos idénticos a los presentes en los sueros de politransfundidos (Melartin y Blumberg 1966).

Quedaba entonces por determinar la razón por la cual un hemofílico de Nueva-York presentaba anticuerpos contra - un antígeno presente en un aborigen australiano. Para ello hicieron numerosos estudios de poblaciones encontrándose -- que el antígeno Au(1) es raro en Norteamérica y Norte de - Europa pero mucho más frecuente en países tropicales y del sureste asiático. (Blumberg y cols. 1970). Vieron también - que era mucho más frecuente en enfermos leucémicos que en - otras enfermedades (Blumberg y cols. 1965). Pensaron entonces que el antígeno Au(1) podía ser una manifestación del - proceso leucémico que produciría alteraciones de las beta-- lipoproteínas del suero haciendo variar su configuración antigénica, o bien que estaría relacionado con un supuesto -- virus productor de la leucemia (Blumberg y cols. 1965). Para probar lo primero hicieron estudios de purificación, caracterización y comparación del antígeno Au(1) con las beta-lipo-

proteínas (Alter y Blumberg 1966). Los resultados mostraron que el antígeno Au(1) estaba relacionado con las beta-lipoproteínas pero que era claramente distinto de ellas. En efecto tenía la misma movilidad electroforética pero poseía mucho menos lípido y su densidad era mucho mayor (entre 1,063 y 1,3). Por inmunodifusión frente a un antisuero apropiado no mostraban identidad antigénica. Sin embargo el estudio de numerosos enfermos leucémicos sí mostraba una relación entre el antígeno Au(1) y esta enfermedad. Se estudió entonces la frecuencia de antígeno Au(1) en aquellas poblaciones predispuestas a padecer leucemias, especialmente en mongólicos que tienen un riesgo de hasta 100 veces superior que las personas normales. En ellos, si estaban internados en grandes instituciones, la incidencia de antígeno Au(1) era muy elevada (Blumberg 1966) (Blumberg y cols. 1967) (Sutnick y cols. 1968) (Melartin y Panelius 1968). Se consiguen así grupos de enfermos antígeno positivos fácilmente asequibles al estudio. Blumberg analizándolos periódicamente vio que aquellos que habían sido positivos la primera vez seguían siéndolo, y los que habían sido negativos persistían negativos. En 1966 sin embargo uno de sus pacientes (J.B.) previamente seronegativo se hizo positivo. Simultáneamente presentó un cuadro de hepatitis. También uno de los miembros de su laboratorio (B.W.), presentó antígeno Au(1) positivo transitoriamente y a continuación un cuadro de hepatitis. Esto le llevó a relacionar por primera vez esta enfermedad con el antígeno Au(1) en un primer estudio de

48 sujetos sospechosos de padecer una hepatitis encontró 10 antígeno Au(1) positivos (Blumberg y cols. 1967). Pronto otros autores confirmaron esta asociación (Vierucci y cols. 1968; Okochi y Murakami 1968; Nordenfelt y Kjellen 1969).

Por su parte Prince (1968) describió un antígeno que llamó SH (de hepatitis sérica) en enfermos con hepatitis post-transfusional y que no existía en las hepatitis infecciosas. Pronto comparándolo con el antígeno Au(1) de Blumberg por inmunodifusión comprobó que daban una línea de identidad, viendo así que se trataba en realidad del mismo antígeno (Prince 1969; Mc Collum 1969).

En un principio se comunicó la asociación del antígeno Au(1) tanto en la hepatitis sérica como en la epidémica (Blumberg y cols 1968); Wright y cols. 1969; Gocke y Kaye 1969). Sin embargo estudios posteriores demostraron -- que el antígeno Au(1) estaba relacionado con la hepatitis sérica (Giles y cols 1969; Krugman y Giles 1970) pero no aparecía en brotes de hepatitis epidémica (Chang y O'Brien -- 1970; Mosley y cols. 1970).

La relación entre la aparición de antígeno Au(1) y hepatitis, la incidencia mucho mayor del antígeno en enfermos mongólicos ingresados en instituciones que en aquellos que permanecían en sus casas y finalmente la observación al microscopio electrónico de partículas semejantes a virus en el suero de enfermos antígeno Au(1) positivos (Bayer y

y cols. 1968; Barker y cols. 1969; Zuckerman 1969) apoyaban que el antígeno Au(1) sea o esté relacionado con un virus.

I-1) TERMINOLOGIA

Cuando Blumberg descubrió por primera vez el antígeno buscando nuevos sistemas polimórficos lo designó con un término geográfico siguiendo una práctica común en genética humana. Esta denominación de Antígeno Australia y su abreviatura de Ag Au(1) ha sido la más utilizada a lo largo del tiempo. Sin embargo dada la gran importancia de la partícula en la hepatitis fueron surgiendo nuevos términos que indicaban su relación. Así Prince (1968)) la llamó antígeno de la hepatitis sérica (SH) y posteriormente se sumaron ambas denominaciones: Antígeno Au/SH.

Al observarse que se podía transmitir por otras -- vías además del suero, este término fué cayendo en desuso y surgió el de antígeno asociado a la hepatitis (HAA) (Mac Collum 1969) que fué adoptado en una conferencia en la universidad de Yale en Junio de 1969.

Finalmente surgió el de Antígeno de la hepatitis - B (Antígeno HB) que parece el más apropiado pues subraya la relación entre el antígeno y este tipo de hepatitis. En -- 1972 el subcomité sobre hepatitis del National Research -- Council Norteamericano recomendó el término (Krugman 1972).

Recientemente (1973) la OMS también ha recomendado la denominación de Antígeno HB y anticuerpo HB (Ag HB y Ac HB), - que es la más utilizada actualmente y la que nosotros emplearemos de ahora en adelante.

I-2) CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS.

=====

Los primeros trabajos de caracterización (Alter y Blumberg 1966) mostraron que el Ag HB era una macromolécula que aparecía en el primer pico de una cromatografía del suero con Sephadex G-200, tenía una movilidad de alfa globulina en electroforésis, parecía tener una pequeña cantidad de lípido pues daba una reacción débil con Sudan negro, y se diferenciaba de las otras lipoproteínas por su reactividad inmunológica y su densidad. Era más denso que las beta-lipoproteínas sedimentando con densidades entre 1,063 y 1,3 y más ligero que la mayor parte de las proteínas del suero que se encontraban en las fracciones de densidad mayor de 1,3.

I-2-1) COMPOSICION

=====

Cuando dos años más tarde fué observado por primera vez al microscopio electrónico, su aspecto hizo pensar que se trataba de un virus (Bayer y cols. 1968). Se intentó entonces comprobar si contenía ácidos nucleicos. Los primeros resultados fueron negativos empleando métodos capaces de detectar un contenido de DNA y RNA del 1 y 10% - respectivamente sobre la cantidad total de proteína (Mill

man y cols. 1970). Más tarde Jozwiak y cols. (1971) con el método de Mejbaun encontraron un 5% de RNA y un pico en el espectro de absorción en los 260 nm que achacaron también al contenido en RNA. Los tests colorimétricos para DNA fueron negativos. Posteriormente Millman y cols. (1971) han confirmado estos resultados.

Jozwiak y cols. (1971) estudiaron también el contenido porcentual de proteína y lípidos. Concluyeron que la composición era:

- Proteína: 70%
- Lípidos: 25%
- RNA: 5%

Vyas y cols. (1972) estudiaron el contenido en péptidos y aminoácidos del antígeno HB. Para ello obtuvieron por Ultracentrifugación en gradientes de ClCs partículas de 20 nm de Ag HB sin contaminación con proteínas plasmáticas. Esta muestra la trataron con dodecilsulfato sódico, mercaptoetanol y fosfato sódico obteniendo dos subunidades de PM 25000 y 32000, lo que confirma los estudios previos de Gerin y cols. (1971) que tras un tratamiento similar obtenían dos polipéptidos de PM 26000 y 32000 en cantidades semejantes y otra proteína en cantidad mucho menor de PM 40.000. En el estudio de aminoácidos que realizaron encontraron un contenido elevado de leucina, prolina y serina y bajo en tirosina (ver tabla I.).

Residuo	Moles %	Residuo	Moles %
Lys	1,9	Ala	3,6
His	0,7	Cys	6,5
Arg	2,6	Val	5,1
Asp	5,5	Met	2,7
Thr	8,2	Ile	5,5
Ser	11,1	Leu	12,5
Glu	5,5	Tyr	2,3
Pro	12,3	Phe	5,9
Gly	7,5	Glc N	trazas

Tabla I: Contenido en aminoácidos del antígeno HB: Media de 3 determinaciones (Vyas GN, Williams EW, Klaus -- GGB, Bond HE, J. Immunol. 108,1117, 1972).

La sorprendente resistencia al calentamiento y a -- las proteasas hizo pensar que podía tener carbohidratos co -- mo elemento estabilizante de la molécula, o como determi -- nante antigénico. Esto fué estudiado mediante tratamiento con periodato y análisis químico (Burrell y cols. 1973). - A través de estos estudios parece que las partículas de Ag HB de 20 nm contienen cantidades significativas de carbohi -- dratos y que éstos son necesarios para la actividad seroló -- gica del determinante antigénico principal.

I-2-2: DENSIDAD:

=====

Después de los primeros trabajos de Alter y Blum -- berg (1966) que indicaron que la densidad debía hallarse -- entre 1,063 y 1,3 estudios posteriores en gradientes de -- diversas sustancias han mostrado que el antígeno HB forma una banda en densidades entre 1,15 y 1,27 (ver tabla II).

D E N S I D A D

	BrK	Sacarosa	ClCs	Tartrato K
Alter y Blumberg(1966)	1,063-1,3			
Gerin y cols(1969)		1,16	1,20	1.15
Barker y cols(1969)			1,22-1,27	
Millman y cols(1970)			1,21	
Kim y Tilles(1973)		1,17	1,216	

Tabla II: Determinaciones de la densidad del Ag HB.

I-2-3) COEFICIENTE DE SEDIMENTACION.

=====

La primera determinación fué hecha por Gerin y cols. (1969) obteniendo un resultado de $S^{\circ}_{20,w}$ de 110 en un gradiente de sacarosa. Estudios posteriores han mostrado que ese resultado es falsamente alto, probablemente por agregación del Ag HB. Así los mismos autores en una publicación posterior dan $S^{\circ}_{20,w}$ de 54 (Gerin y cols 1971) y Kim y Tilles (1973) dan un valor de $S^{\circ}_{20,w} = 40,2$.

I-2-4) COEFICIENTE DE DIFUSION

=====

Sólo ha sido calculado por Kim y Tilles (1973) obteniendo un valor a 20° C de: $2,278 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$.

I-2-5) PESO MOLECULAR.

=====

Ya Alter y Blumberg (1966) al observar que en una cromatografía en Sephadex G-200 el Ag HB salía en el pico excluido, predijeron un PM elevado. Kim y Tilles (1973) --

calculándolo por la ecuación de Svedberg lo cifran en $2,4 \times 10^6$.

I-3) METODOS DE PURIFICACION:

=====

La purificación del antígeno HB ha sido conseguida en general partiendo del suero de enfermos portadores. Para ello se han aprovechado aquellas propiedades del antígeno que más le diferencian de las proteínas séricas. Estas propiedades son:

- Su peso molecular elevado.
- Su densidad homogénea.
- Su resistencia al tratamiento enzimático.
- Su movilidad electroforética.

Blumberg y cols. tras sus primeros trabajos de caracterización del antígeno desarrollaron un método de purificación en el que servían ya de algunas de estas propiedades. El método consta de cinco pasos (Millman y cols.1970):

- 1) Ultracentrifugación del suero 18 horas a 300.000g.
- 2) Tratamiento enzimático con amilasa, lipasa, neuraminidasa, tripsina, fosfolipasa C y pronasa.
- 3) Filtración en gel (Sephadex G-200).
- 4) Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.
- 5) Ultracentrifugación en gradiente de cloruro de Cesio.

Gerin y cols. (1971) simplificaron el método utili

zando únicamente tres pasos; los dos primeros consistentes en ultracentrifugaciones en gradiente de cloruro de Cesio y el último en separación en gradiente de densidad de saca rosa. Este método fué adaptado para el aislamiento en gran escala del Ag HB a partir del suero utilizando rotores de ultracentrífuga de gran capacidad.

con ligeras modificaciones este método de purificación del antígeno HB por ultracentrifugación en gradientes de Cl Cs y sacarosa ha sido utilizado por numerosos autores (Vyas y cols. 1972; Lander y cols. 1972; Burrell y cols 1973; Imai y cols 1974.). Otros sin embargo han conseguido la purificación por otros métodos:

- Sukeno y cols (1972) siguen el método de Blumberg (Millman y cols. 1970) introduciendo al final una cromatografía en DEAE-celulosa para completar la purificación.
- Jozwiak y cols (1971) para sus estudios sobre la presencia de ácidos nucleicos en el Ag HB, lo purifican mediante electroforesis preparativa en bloque de almidón seguida de filtración en columna de Sephadex G-200.
- Frei y cols (1973) purifican el antígeno HB por un procedimiento en cuatro pasos que comprende primero una precipitación del suero Ag HB positivo con sulfato amónico saturado al 20%, seguida de una nueva precipitación del sobrenadante con sulfato amónico saturado al 50%. Ambos precipitados disueltos en agua destilada son dializados frente a --

TRIS-ClNa 0,3 M y filtrados por Sephadex G-200. Las fracciones Ag HB positivas son concentradas y separadas en -- electroforesis en bloque de agarosa. Finalmente completan la purificación con una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa.

-Kim y Tilles son los primeros en estudiar la resistencia del Ag HB frente a la pepsina y en utilizar este tratamiento como primer paso para su purificación. Esta la completan por una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. (Kim y Tilles 1973).

- Houwen y cols (1973) logran eliminar totalmente las proteínas del suero mediante inmunoadsorción tras una purificación previa mediante ultracentrifugación seguida de cromatografía en Sepharosa 4B.

Como vemos todos los métodos empleados son técnicamente complejos y de larga duración no existiendo un método standard para purificar el antígeno HB.

I-4) CRITERIOS DE PUREZA:

=====

Tras los métodos de purificación referidos los diversos autores comprueban la pureza del Ag HB resultante por tres métodos principales:

- Inmunodifusión e inmunolectroforesis con anticuerpos contra las proteínas del suero humano. Son métodos específicos y de gran sensibilidad, especialmente el primero de

ellos. Son los más utilizados (Millman y cols 1970; Vyas y cols 1972; Gast y cols. 1973; Frei y cols. 1973).

- Electroforesis en gel de poliacrilamida. Utilizado por Gerin y cols. (1971) y Kim y Tilles (1973). Es un método muy sensible para detectar proteínas séricas, pero con el inconveniente de que las de mayor tamaño pueden no penetrar en él (macroglobulinas y el propio Ag HB).

- Inmunización de animales (conejo, cobaya) con la preparación purificada y comprobación de que da lugar a un antisuero monoespecífico (Gast y cols. 1973). Es el método más sensible si las condiciones de inmunización son adecuadas.

I-5) MORFOLOGIA:

=====

Bayer y cols. en 1968 describieron por primera vez partículas con caracteres morfológicos semejantes a algunos virus en sueros antigénicos. Estas partículas de un diámetro de 180-210 Å eran en su mayoría esféricas, existiendo otras alargadas con una longitud variable entre 500 y 2.300 Å. Al añadir Ac HB observaron que reaccionaban específicamente con estas partículas agregándolas. Estudios más detallados (Barker y cols 1969) permitieron demostrar que las partículas esféricas estaban compuestas por subunidades de 30 Å de diámetro.

Poco después se describió un método sencillo ---

(Hirschmann y cols 1969) utilizando la agregación de las partículas al añadir anticuerpos, para detectarlas en -- sueros de enfermos. Para ello es suficiente sedimentar-- las por centrifugación a 25.000 r.p.m. durante 10 mn y - observarlas al microscopio electrónico con tinción nega- tiva.

En 1970 Dane y cols. describen por primera vez un tercer tipo de partículas que aparece en algunos sueros Ag HB positivos. Estas son esféricas con un diámetro apro- ximado de 42 nm y poseen un núcleo central de 27 nm. La - capa externa de estas partículas parece estar compuesta - del mismo material que las dos descritas previamente y es aglutinada con ellas por anticuerpos específicos. Por el contrario el núcleo interno es antigénicamente diferente del resto de las partículas (Almeida y cols. 1971; Hoof- nagle y cols 1973).

Huang (1971) estudiando al microscopio electrónico biopsias hepáticas de enfermos con antígeno HB en sangre, observó en el interior del núcleo de los hepatocitos par- tículas esféricas de 230 Å de diámetro. Estudios poste-- riores con inmunofluorescencia y microscopía electrónica han demostrado que estas partículas que se hallan en el interior del núcleo son idénticas a la porción interna - de las partículas de Dane, mientras que en el citoplasma aparecen otras también esféricas, pero algo más pequeñas

que corresponden a las que se encuentran en el suero en mayor proporción (diámetro 180-210 Å) (Jackson y cols 1973; Brzosko y cols. 1973-1974).

I-6) VIRUS DE LA HEPATITIS B.

=====

Es indudable que el suero de enfermos Ag HB positivo contiene el virus de la hepatitis B, puesto que transmite la enfermedad. Cuando se observó por primera vez al microscopio electrónico el Ag HB y se vió que estaba constituido por partículas esféricas y tubulares de 180-210 Å de diámetro, se pensó que estas últimas serían agregados o --precursores de las primeras, que serían el verdadero virus (Zuckerman 1969; Shulman y cols 1970) En efecto su diámetro es sólo muy ligeramente inferior al de los picornavirus, como el de la polio y su superficie muestra una subestructura similar a los capsomeros, las unidades morfológicas que forman la capsida de ciertos virus.

Las partículas de 20 nm contienen al menos dos proteínas de peso molecular 26.000 y 32.000 respectivamente (Gerin, cols. 1971, Vyas y cols. 1972). Para codificarlas el virus necesitaría contener al menos ácido nucleico de ---600.000 de peso molecular, es decir aproximadamente un 15% del peso molecular de la partícula de 20 nm (Javitt y cols. 1973).

Al demostrar Millman y cols (1970) que estas partí
culas

purificadas no contenían una cantidad detectable de ácidos nucleicos, se descartaba prácticamente que fueran ellas el verdadero virus.

En 1971 Almeida y cols tratando con detergente --- (tween 80) las partículas de Dane, observaron como éstas - se separaban en una capa externa y una partícula interna - esférica de 27 nm de diámetro con aspecto de Rhinovirus. A Esto les hizo pensar que esta zona interna debía ser el -- verdadero virus.

La presencia de gran cantidad de esta zona central - de la partícula de Dane en el núcleo de los hepatocitos -- de enfermos con hepatitis B (Huang 1971; Brzosko y cols. - 1973, 1974) también apoya el que se trate del núcleo viral que se reproduce en el núcleo de las células infectadas. - El virus migraría entonces al citoplasma celular donde se-- ría recubierto por una capa de proteína (Ag HB) convir-- tiéndose en la partícula de Dane. Esta forma de replica-- ción del virus sería similar a la de los virus del herpes y la leucemia de los ratones, que tienen una capa protei-- ca sintetizada en el citoplasma.

Por razones desconocidas, el RNA mensajero del ci-- toplasma dirigiría la producción de un exceso de cubierta proteica que constituiría los dos tipos de partículas (es-- féricas y tubulares) que predominan en el suero de los en-- ferros. Esta producción de proteínas en exceso también --

ocurre en otras infecciones virales. Así Adenovirus y mixovirus por ejemplo producen entre diez y mil veces de material proteico de recubrimiento en exceso. En el caso del virus de la hepatitis B este exceso debería ser mayor, tal vez de hasta un millón de veces. (Maugh II,1972).

Esta teoría que es hoy compartida por la mayoría de los autores (Ed.Lancet 1973), no podrá sin embargo ser comprobada mientras no se logre el cultivo del virus en el laboratorio.

I - 7) S U B T I P O S =====

Levene y Blumberg en 1969 fueron los primeros en descubrir la existencia de diferentes subtipos antigénicos, estudiando la reactividad de dos antisueros de conejo producidos por inmunización con sueros de diferentes enfermos. Estudios posteriores de Le Bouvier (1971), Kim y Tilles (1971), Bancroft y cols (1972), Magnus y Espmark (1972) y otros han conducido a diferenciar los determinantes a, d, x, y, w, r.

El antígeno a es específico del grupo y por lo tanto común a todas las partículas de antígeno HB. Por el contrario los determinantes d é y se excluyen mutuamente, y lo mismo ocurre con w y r. Esto da lugar a cuatro posibles combinaciones de las cuales tres (adw, ayw,

adr) son conocidas desde hace más de dos años pero sólo recientemente se han aislado los primeros ejemplos de la cuarta (ayr) (Le Bouvier 1973).

Cuando un sujeto es infectado por Ag HB continúa produciendo antígeno del mismo subtipo y si lo transmite los individuos infectados poseen también el mismo subtipo. La presencia de estos subtipos es pues muy útil para la realización de estudios epidemiológicos (Mazzur y cols. 1973,1974), habiéndose observado que el w es frecuente en USA, Suramérica, Europa y Africa, mientras el r predomina en Asia y el Pacífico. El d es común en portadores de USA, Norte de Europa, Asia y Oceanía, y constante en el Japón. Por el contrario en Africa, Australia, India, Italia, Grecia y Yugoslavia es más frecuente el y.

Se ha pensado que la infección por diferentes -- subtipos podría dar lugar a diferentes situaciones clínicas. Incluso se llegó a comprobar en algunos sitios una cierta correlación entre el subtipo y la evolución del -- proceso (Nielsen y Le Bouvier (1973). Sin embargo estudios más completos inclinan a pensar que esos resultados se debieron exclusivamente a factores epidemiológicos y no a diferencias biológicas intrínsecas entre los subtipos (Feinman y cols. 1973; Le Bouvier 1973).

I-8) METODO PARA DETECTAR Ag y Ac HB
=====

I-8-1) INMUNODIFUSION:

Esta técnica, con la que Blumberg descubrió el antígeno HB, es la más sencilla y la de empleo más generalizado. Tiene la ventaja de permitir la comparación con un suero control, lo que evita falsos positivos. También -- permite buscar simultáneamente el antígeno y el anticuerpo en la misma placa.

Como inconvenientes tiene su duración (se realiza la lectura al cabo de las 24-48 horas) y su falta de sensibilidad, especialmente para la determinación de anticuerpos.

I-8-2) INMUNOELECTROSMOFORESIS:

Es un método rápido y sencillo que permite determinar tanto el antígeno como el anticuerpo simultáneamente - en un gran número de sueros.

Se basa en que en una electroforesis el antígeno - se mueve hacia el ánodo (movilidad de alfa-2 globulina), - mientras los anticuerpos lo hacen hacia el cátodo por el - flujo electroendosmótico (movilidad de gamma globulina). - Esto hace que se encuentren rápidamente dando una línea de

precipitación al cabo de una o dos horas. Fué empleada para el antígeno y el anticuerpo HB por primera vez por Beda rida y cols. 1969). Desde entonces se han introducido muchas modificaciones (Gocke y Howe 1970; Prince y Burke --- 1970). Tiene su mayor aplicación para detectar los portado res de Ag Hb en los bancos de sangre. En ocasiones pueden observarse falsos positivos. Su sensibilidad es similar o ligeramente superior a la inmunodifusión.

I-8-3) FIJACION DE COMPLEMENTO.

Esta técnica es más sensible que las anteriores -- tanto para la determinación del antígeno (100 veces como - del anticuerpo (20-40 veces) (Taylor 1972). Permite además una determinación cuantitativa. Existen diversas modifica ciones (Purcell y cols. 1969; Shulman y Barker 1969). Si - se incuba sólo durante sesenta minutos a 37°C., la técnica puede ser completada en dos horas. Con frecuencia los sue ros probados tienen actividad anticomplementaria debido a la presencia de complejos antígeno-anticuerpo (Shulman y Barker 1969).

I-8-4) MICROSCOPIA ELECTRONICA.

Es muy útil para detectar inmunocomplejos Ag-Ac HB. Es la única técnica que permite detectar el Ag HB sin nece sidad de utilizar anticuerpos específicos. Sin embargo con el uso de estos anticuerpos para formar complejos con el -

uso de estos anticuerpos para formar complejos con el antígeno no es como la técnica resulta más sensible y más simple --- (Hirschmann y cols. 1969). Es muy rápida, pero tiene el inconveniente de necesitar equipo y personal especializados. - Su sensibilidad es unas cuatro veces superior a la inmunodifusión (Shulman y Barker 1969).

I-8-5) INMUNOFLUORESCENCIA:

Es utilizada para detectar el antígeno HB en tejidos. Fué empleada por primera vez por Millman y cols. (1969) para estudiar células obtenidas de biopsias hepáticas. Coyne y -- cols. (1970) ampliaron el estudio a células de bazo, médula ósea, testículos, y mesenterio. Otros autores emplean cortes de tejido hepático (Nowoslawski y cols. 1970, Hadziyannis y cols. 1972; Martínez Vázquez y cols. 1973; Sánchez-Cuenca y cols. 1974).

Se ha utilizado tanto el método directo con anticuerpos específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína - como el indirecto con Ac HB sin marcar, añadiendo luego suero antiglobulina marcado. La especificidad se comprueba en - el primer caso bloqueando la reacción con antisuero no conjugado y en el segundo empleando suero no específico en lugar del suero anti-HB (Coyne y cols. 1970).

Este método no sirve para detectar el Ag HB en el -- suero. Para detectar anticuerpos circulantes Hadziyannis ha introducido una técnica en la que utiliza como sustrato, cor-

tes de hígado conteniendo antígeno HB (Hadziyannis 1972). Esta técnica es más sensible que la inmunodifusión y la inmuno electrosmoforesis pero no es cuantitativa y necesita además cortes de hígado Ag HB positivos, de los que no siempre es posible disponer.

I-8-6) RADIOINMUNOENSAYO:

Es el método más sensible para la determinación del Ag y Ac HB. Fue utilizado por vez primera por Walsh y cols. (1970). Utilizaban Ag HB marcado por I^{125} y separaban la porción unida al anticuerpo de la libre por cromatoelectroforesis. Este método necesita varios días para su realización (3-6- días). Después se han descrito numerosas modificaciones que acortan la duración de la prueba. Así Aach y cols. (1971) describen un método de doble anticuerpo que puede completarse en 18 horas. Hollinger y cols. (1971) describen un método con soporte sólido para el suero anti-HB con lo que simplifican la separación del antígeno marcado libre del ligado al anticuerpo.

Estas técnicas pueden ser adaptadas para detectar tanto el antígeno como el anticuerpo HB. Todas ellas utilizan Ag HB marcado, siendo condición indispensable para su realización que el Ag HB esté purificado. Ling y Oberby (1972) por el contrario modificaron el método marcando el Ac HB en lugar del antígeno. Esta técnica sin embargo necesita anticuerpos de gran pureza para evitar falsos positivos (Cameron y Dane -

1974) y no puede ser aplicada a la determinación de Ac HB.

I-8-7) HEMAGLUTINACION PASIVA E INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION:

Fuó aplicada a la determinación del Ag HB por primera vez por Vyas y Shulman (1970). Utilizaron hematíes humanos - grupo O recubiertos de Ag HB mediante CrCl_3 . Los sueros conteniendo Ac HB aglutinan estos hematíes. Para detectar el Ag HB se prueba la capacidad del suero problema para inhibir la hemaglutinación provocada por una cantidad conocida de Ac HB. Para su realización necesita de Ag HB purificado. Es una técnica rápida (puede hacerse en dos o tres horas) y muy sensible, especialmente para la determinación de Ac HB, igualando al radioinmunoensayo. Entre estas dos técnicas, parece que la hemaglutinación sería de mayor sensibilidad para detectar anticuerpos IgM (Hollinger y cols. 1971).

Recientemente se han descrito nuevas técnicas de hemaglutinación pasiva para la determinación de Ag HB. Utilizan hematíes recubiertos de Ac HB. Estas técnicas, mucho más simples que la inhibición de la hemaglutinación son sin embargo menos sensibles y pueden dar falsos positivos (Reesink y cols 1973, Cayser y cols. 1974, Chrystie y cols. 1974).

I-8-8) DETERMINACION DE LOS SUBTIPOS DEL ANTIGENO HB:

La mayor parte de los estudios para describir nuevos

subtipos del antígeno HB han sido realizados por inmunodifusión (Levene y Blumberg 1969; Le Bouvier 1971; Bancroft y cols. 1972). Sin embargo, posteriormente se han montado otros métodos buscando mayor sensibilidad y menor gasto de reactivos. Así Holland y cols. (1972) han descrito su determinación por inmunoelectrosmoforesis. Ginsberg y cols. (1972) y Aach y cols. (1973) lo han hecho por radioinmunoensayo y recientemente Gold y cols. (1974) han publicado un estudio realizado por hemaglutinación pasiva. Estos dos últimos métodos son indudablemente los de mayor sensibilidad.

I-9) EPIDEMIOLOGIA DE LA HEPATITIS B:

Desde antes del descubrimiento del antígeno Australia se distinguían dos tipos de hepatitis víricas. La hepatitis A, epidémica o de periodo de incubación corto y la hepatitis B, sérica o de periodo de incubación prolongado. Se pensaba que ambas debían estar producidas por virus diferentes dado que la primera tenía un periodo de incubación entre 20 y 40 días y podía transmitirse tanto por vía oral como parenteral, mientras que la segunda tenía un periodo de incubación entre 60 y 160 días y se consideraba que sólo se podía transmitir por vía parenteral (WHO Expert committee on hepatitis, 1964). Cuando se comprobó que el Ag Australia sólo estaba en relación con la hepatitis B (Krugman y Giles 1970) se pudo disponer de un marcador de este tipo de hepatitis que permi-

tía estudiar bien sus vías de propagación. Ya en los años 40 algunos autores habían descrito algunos casos de aparente - transmisión de la hepatitis sérica por vía no parenteral (Pro pert 1938, Findlay y cols. 1944, Bradley 1946) sin embargo da do el escaso número de casos no podía descartarse que se tra tara de una hepatitis A coincidente. Al poderse distinguir -- con seguridad las hepatitis B, mediante el antígeno HB, se ob servó que un gran número de ellas (hasta el 50%) no tenían -- ningún antecedente de inoculación parenteral (Prince 1969, -- Prince y cols 1970, Cossart y Vahrman 1970). Por otra parte - comenzaron a observarse transmisiones del Ag HB de marido a - mujer (6 casos Hersh y cols 1968) y de padres a hijos o entre hermanos (Bancroft y cols 1971). Estos casos hacían suponer - una transmisión no parenteral, por vía oral (por presencia del virus en orina, heces, saliva, sudor, etc..) y/o por contagio sexual.

I-9-1) VIA ORAL:

Dado que el Ag HB es resistente a enzimas proteolíti-- cos (pepsina, tripsina: ver III), esta vía de penetración en el organismo parece posible. Krugman y cols (1967) y Giles y cols. (1969), lograron transmitir la hepatitis B a niños - subnormales por vía oral, si bien la dosis necesaria era muy superior a la que era capaz de producir la enfermedad inocula da por vía parenteral.

Otros autores han descrito hepatitis B aparecidas en -

técnicos de laboratorio después de la ingestión accidental - de suero Ag HB positivo (Westwood y cols 1973).

Es entonces importante conocer por qué vías puede ser eliminado el Ag HB del organismo.

Heces:

Tras intentos infructuosos de Shulman (1970), Grob y Jemelka (1971) hallaron el Ag HB en las heces de once enfermos con hepatitis B.

Posteriormente se ha comprobado que el Ag HB persiste en las heces de esos enfermos algún tiempo después de su desaparición del suero lo que hace pensar que podría replicarse en la mucosa intestinal (Ogra 1973).

Bilis:

En las bilis recogidas por sondaje duodenal de enfermos Ag HB positivos no se detecta el Ag HB (Akdamar y cols -- 1971). Sin embargo sí aparece en la bilis recogida directamente de la vesícula, probablemente por encontrarse aquí mucho más concentrada (Serpeau y cols 1971).

Orina:

Ya Findlay y Willcox comunicaron en 1945 haber transmitido hepatitis víricas por la orina, aunque estos resultados no pudieron ser confirmados por otros autores (Mac Callum y Bradley 1944). Tras el descubrimiento del Ag HB los primeros intentos para detectarlo en orina (concentrada 100 veces) no dieron resultado (Shulman 1970).

Sin embargo Tripatzis y Horst (1971) lo detectaron en la orina de una enferma tras un largo proceso de concentración. Este hallazgo ha sido confirmado por Blainey y cols. (1971), Apostolov y cols. (1971) y Ogra (1973).

Heathcote y cols (1973) en orinas con reacciones de complemento positivas para el Ag HB no han sido capaces de demostrarlo por microscopía electrónica, por lo que piensan que estas orinas probablemente no sean capaces de transmitir la enfermedad.

Saliva y secreción nasofaríngea:

También aquí tras unos primeros hallazgos negativos de Shulman (1970) en saliva concentrada 10 veces, otros autores (Word y cols. 1972 y Heathcote y cols. 1974) si han hallado el Ag HB, excluyendo que dependiera de la presencia de sangre en ella. Ogra (1973) también ha encontrado el Ag HB en líquido de lavado nasofaríngeo de algunos enfermos con hepatitis B.

Sudor:

Recientemente Telator y cols. (1974) han encontrado por inmunodifusión el Ag HB en el sudor de 4 de 10 enfermos con antigenemia.

I-9-2) INHALACION:

Esta vía es defendida por Almeida y cols (1971) tras observar como apareció un brote de hepatitis en una unidad de diálisis tras un incidente en el que sangre Ag HB positiva --

fué esparcida por la habitación al escaparse por un catéter.

I-9-3) TRANSMISION VENEREA:

Cuando Hersh y cols. (1971) observaron la transmisión del Ag HB de marido a mujer en 6 casos, supusieron que el contagio podía haber ocurrido por vía sexual. Estudios posteriores de Heathcote y Sherlock (1973), Fulford y cols. (1973) -- Jeffries y cols. (1973) y Henigst (1973) han aportado datos epidemiológicos que sugieren una transmisión venérea de la hepatitis B, especialmente entre homosexuales.

Recientemente Heathcote y cols. (1974 a) han logrado detectar el Ag HB en el semen, y Mazzur (1973) ha señalado la importancia que la sangre menstrual puede tener en la transmisión de la enfermedad.

I-9-4) VIA PARENTERAL:

La transmisión por esta vía puede producirse de muy diversas maneras:

Transfusiones de sangre y sus derivados:

Aunque ahora se comprueba de rutina en los bancos de sangre si este material es Ag HB negativo, incluso los métodos más sensibles no llegan a detectar cantidades muy pequeñas del Ag que son capaces de producir la enfermedad (Hollinger y cols. 1973).

Material contaminado:

Agujas, etc.. previamente utilizadas producen hepatitis con frecuencia por pinchazo accidental al personal sanitario (cirujanos, enfermeras, etc..) o por mala esterilización en drogadictos.

Insectos:

Prince y cols. (1972 a) demostraron la presencia de Ag HB en gran número de mosquitos cazados en Kenya y Uganda. -- Metselaar y cols. (1973) han comprobado la presencia del antígeno en mosquitos *Aedes aegypti* hasta 45 días después de ser inoculados. Estos datos permiten suponer que los mosquitos juegan un papel importante como vectores del virus de la hepatitis B, al menos en zonas tropicales.

II - O B J E T I V O S
=====

Cuando iniciamos este trabajo en 1972 ya había quedado claramente establecida la relación entre antígeno Australia y hepatitis B (Krugman y Giles 1970) y se había comprobado que este tipo de hepatitis de incubación prolongada podía transmitirse por vía no parenteral (Krugman y --- cols. 1967). También se había observado que mientras la mayoría de las personas que padecen una hepatitis B tienen antígeno HB en sangre tan sólo durante algunos días o semanas, otras, especialmente enfermos con ciertos procesos -- crónicos (síndrome de Down, lepra lepromatosa, leucemias, insuficiencias renales crónicas) evolucionan hacia hepatis crónicas con persistencia indefinida del antígeno HB - en sangre (Blumberg y cols. 1970 b).

La determinación del Ag HB se hacía de rutina en muchos centros tanto para el diagnóstico de las enfermedades hepáticas como para detectar a los portadores y evitar --- transfundir su sangre. Estaban en marcha numerosos estu--- dios de poblaciones para conocer la incidencia del Ag HB, (Blumberg y cols. 1970 b), se describían diferentes subtipos del Ag HB (Le Bouvier 1971, Bancroft y cols. 1972), se buscaba la presencia de las distintas partículas observa-- das al microscopio electrónico en diversos grupos de enfermos (Nielsen y cols. 1972) y se estudiaban los cuadros clínicos aparecidos en sujetos inoculados con dosis variables de antígeno (Barker y cols. 1970) y por vías diferentes -- (Krugman y Giles 1970). Sin embargo pese a la gran cantidad

de grupos trabajando sobre el Ag HB y su relación con la hepatitis, no se prestaba apenas atención a la reacción inmunológica del huésped frente al Ag HB. Esto estaba motivado, pensamos, porque los métodos más utilizados para la detección del Ag y Ac HB (inmunodifusión, inmunolectrosmoforesis y fijación de complemento) no lograban detectar Ac HB más que en casos muy aislados, que en general correspondían a sujetos politransfundidos (Gravila y cols. 1972, -- North y cols. 1972).

Cabía suponer que la falta de anticuerpos detectables por estos métodos en enfermos que habían padecido una hepatitis B, se debiera a falta de sensibilidad de los métodos empleados.

La puesta a punto de dos nuevas técnicas de gran sensibilidad para la determinación de Ag y Ac HB, la hemaglutinación pasiva (Vyas y Shulman 1970) y el radioinmunoensayo (Walsh y cols. 1970) abría la posibilidad de un estudio detallado de la respuesta de anticuerpos frente al Ag HB.

Ya en las primeras determinaciones con ambos métodos se observaba una alta incidencia de anticuerpos (Vyas y Shulman 1970; Lander y cols. 1972) en los sueros probados.

Sin embargo estas técnicas no desplazaron a las empleadas previamente, debido a su mayor complejidad y en especial a que ambas necesitaban Ag HB purificado, dependiendo su sensibilidad y su especificidad del grado de pu

rificación del antígeno empleado.

Entonces nuestro primer objetivo fué lograr la purificación del antígeno HB como paso previo para el estudio de la respuesta inmunológica frente a él.

Con el antígeno HB purificado teníamos que mon--
tar un método de gran sensibilidad para la determinación del Ac HB. Esto nos iba a permitir estudiar la incidencia de estos anticuerpos tanto en personas sanas, sin antecedentes conocidos de posible transmisión del virus por vía parenteral (transfusiones, uso de narcóticos etc..) - como en grupos de personas especialmente expuestos a material Ag HB positivo tanto por vía parenteral (enfermos - hospitalizados, transfundidos..) como no parenteral (familiares que conviven con portadores crónicos, personal hospitalario etc..) y deducir de allí el grado de diseminación del virus en la población general y la frecuencia de su transmisión no parenteral.

Se ha observado que tras haber padecido una hepatitis vírica quedaba una resistencia a padecer de nuevo - el mismo tipo de hepatitis (Krugman y Giles 1970). Como - nosotros habíamos encontrado anticuerpos en sujetos sin -- historia previa de hepatitis su revisión periódica nos iba a permitir estudiar si la presencia de estos Ac HB representa una protección frente al virus de la hepatitis B, dado que muchos de ellos estaban muy expuestos a material capaz de transmitir la enfermedad (enfermos en programa de diálisis, personal hospitalario trabajando en zonas de alto riesgo).

La determinación de Ag y Ac HB en aquellos enfermos con hepatopatías crónicas de etiología no filiada nos iba a indicar si existe alguna relación entre estos procesos y el virus de la hepatitis B.

Conocida la existencia de enfermos crónicos con procesos que se acompañan de un déficit en la respuesta inmunológica -lepra lepromatosa (Waldorf y cols. 1966), insuficiencia renal avanzada (Wilson y cols. 1965; Newberry y Sanford 1971) - y que tras la aparición del Ag HB en su sangre, presentan hepatitis crónicas con persistencia indefinida del antígeno (Blumberg y cols. 1970 b) cabía pensar que este comportamiento fuera debido a una incapacidad en la producción de Ac frente al Ag HB. El estudio de la capacidad de producción de Ac HB en enfermos con insuficiencia renal crónica, era pues otro de los objetivos de este trabajo.

Existen personas que sin evidencia de ninguna otra enfermedad son portadores crónicos de Ag HB. Algunas de éstas tienen hepatopatías crónicas de diversa intensidad, -- mientras otras no presentan ningún signo de lesión hepática, incluso en el estudio biopsico del hígado (Reinicke y cols. 1972 ; Hadziyannis y cols. 1972; Rayon y cols. 1973). Una explicación posible para esta observación sería que el virus de la hepatitis B no tuviera poder patógeno y que la existencia de daño hepático dependa de factores del huésped, especialmente de la respuesta inmunológica frente al Ag HB. Por ello otro de los objetivos de nuestro trabajo -

era relacionar la existencia de lesión hepática con la respuesta inmunológica medida por la presencia de los Ac HB - en los portadores de Ag HB.

Otro de los motivos principales de este trabajo era estudiar la evolución de las hepatitis agudas, observando cual es el patrón de aparición de Ac HB y el posible papel de estos Ac en la evolución del proceso.

El Ag HB aparece en el suero semanas antes de presentarse los primeros síntomas de la enfermedad. Habitualmente desaparece muy pronto después de comenzar el cuadro clínico (Shulman 1970). Esto hace que con frecuencia ya se haya negativizado cuando el enfermo llega por primera vez al hospital. Era importante estudiar si el patrón de aparición de los Ac permitía asegurar en estas hepatitis con determinaciones de Ag HB negativo cuando se trataba de una hepatitis B.

La aparición de una epidemia de hepatitis B en la Unidad de Hemodiálisis de la F.J.D. en el último trimestre de 1973, nos ofreció la oportunidad de estudiar este tipo de hepatitis en enfermos con insuficiencia renal y obtener valiosos datos de susceptibilidad a la enfermedad y evolución del proceso con determinaciones seriadas de Ac HB.

Para el mejor estudio de los Ac HB necesitábamos también estudiar la clase de Inmunoglobulinas de que se trataba. Esto lo hicimos mediante el tratamiento de los sueros con 2-mercaptoetanol.

Finalmente, estudiar la respuesta inmunológica tan sólo desde el punto de vista humoral nos daba necesariamente una visión parcial del problema. Por ello nos propusimos estudiar la respuesta celular en un cierto número de casos. Para ello contábamos con el Ag HB purificado, lo -- que representaba una enorme ventaja para montar pruebas específicas.

III - PURIFICACION DEL ANTIGENO HB.
=====

III-1 - MATERIALES Y METODOS.-

III-1-1) MATERIALES:

=====

Antígeno HB.- Para su purificación partimos del suero o plasma de donantes en los que se había demostrado la presencia de antígeno mediante inmunodifusión e inmunolectroforesis. Elegimos aquellos que a diluciones mayores seguían mostrando una línea de precipitación frente a suero anti-HB.

Anticuerpo HB.- Para la identificación del antígeno por inmunodifusión, inmunolectroforesis e inmunosmoelectroforesis utilizamos suero de conejo anti-Au/SH (Behringwerke AG).

PBS: ClNa 0,15 M. tamponado a pH 7,2 con fosfatos 0,01 M.

Tampón Glicina: Solución A: Glicina 0,1 mol. en ClNa 0,1 N.

Solución B: HCl 0,1 N.

Para pH 2,8; 75,6% de A + 24,4% de B.

III-1-2) INMUNODIFUSION:

=====

Para el método de doble difusión empleamos Special Agar-Noble (Difco) al 1% en ClNa 0,15 M con azida sódica -- (NaN₃) 0,05% que fundimos en baño de agua hirviendo y vertemos en placas de Ouchterlony, echando 8ml. en cada placa de 7 cm. de

diámetro. Lo dejamos solidificar en posición horizontal. Más adelante cortamos con un sacabocados 6 agujeros periféricos y uno central de 6 mm. de diámetro y separados entre sí 3 mm. de borde a borde.

Para la demostración simultánea de Ag y Ac HB ponemos suero de conejo anti-HB en el pocillo central, alternando en los periféricos los sueros problema con suero Ag HB positivo. Después de incubar las placas en cámara húmeda a temperatura ambiente, hacemos la lectura a las 24 y 48 h. La aparición de una línea de precipitación entre el suero problema y el suero anti-HB que muestre al menos una identidad parcial con las que aparecen entre los sueros Ag HB positivos y el suero anti-HB indica la presencia de Ag HB en el suero problema. Si la línea de precipitación aparece entre el suero problema y los sueros Ag HB positivos y presenta asimismo identidad con la aparecida entre el suero anti-HB y el control Ag HB positivo, indica la presencia de Ac HB en el suero problema (fig. 1).

III-1-3) INMUNOELECTROFORESIS:

=====

Empleamos Special-Agar-Noble (Difco) al 1,25% en buffer de veronal-veronal sódico pH 8,6 fuerza iónica 0,03. Lo fundimos en un baño de agua hirviendo y echamos 6 ml. en cada molde de 7,5x4 cm. Lo dejamos solidificar en posición horizontal. A continuación cortamos con un sacabocados 2 agujeros de 1 mm. de diámetro, en el centro de la placa y sepa

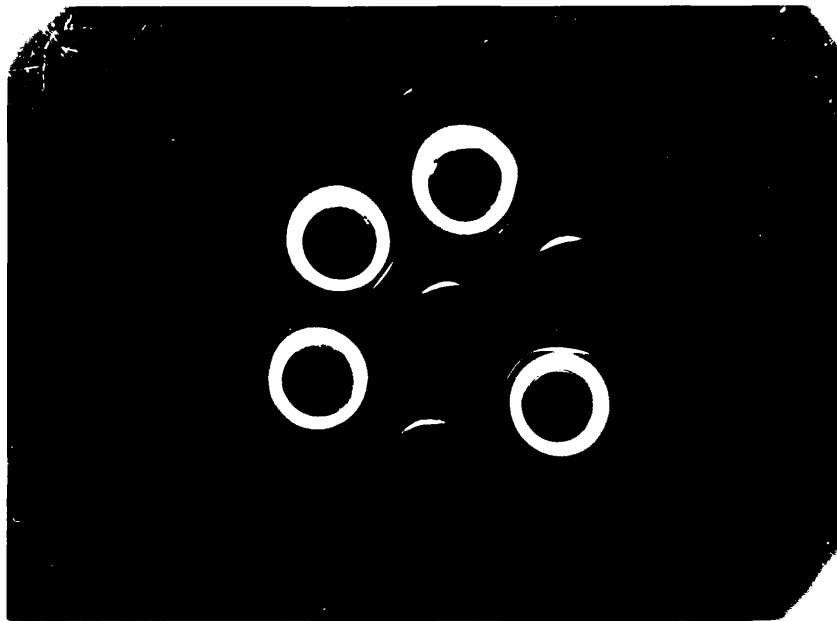


Fig. 1: Inmunodifusión para determinación de Ag y Ac HB.
Pocillo central: Antisuero Au/SH.
Pocillos periféricos: C: suero control Ag HB positivo; 1, 2 y 3 sueros problema. El 1 es positivo para Ac HB, el 2 positivo para Ag HB y el 3 negativo para ambos.



Fig. 2:- Inmunoelectroforesis con antisuero Au/SH.
Arriba suero normal: No hay línea de precipitación con el antisuero.
Abajo Ag HB purificado: Línea de precipitación en la zona de las alfa 2.

rados entre sí 16 mm. Estos pocillos se rellenan totalmente con los antígenos (sueros, etc..) que queremos probar. Introducimos la placa en una cubeta de electroforesis, estableciendo contacto entre el tampón de la cubeta (buffer de veronal-veronal sódico pH 8,6 fuerza iónica 0,06) y los extremos de la placa de agar con tiras de papel de filtro. Tras dejar pasar una corriente de 120 V. 15 mA durante 70 mn, cortamos una trinchera de 65x2 mm. equidistante de ambos pocillos, -- que se rellena con el antisuero (suero anti HB, antihumano, etc.., según los antígenos que queramos poner de manifiesto) y ponemos a incubar la placa en una cámara húmeda a temperatura ambiente. La lectura se realiza a las 24 y 48 horas observando las líneas de precipitación aparecidas y su movilidad electroforética (Fig. 2).

III-1-4) ULTRACENTRIFUGACION;

=====

Utilizamos una ultracentrífuga preparativa Spinco L2 de Beckman con rotor SW 25-2 con capacidad total de 150 ml o bien rotor SW 50L con capacidad para 15 ml.

III-1-5) DETERMINACION DE LA CANTIDAD DE PROTEINA;

=====

Método de Folin-Ciocalteu. Tomamos 1 ml. de diluciones sucesivas de la muestra. Añadimos a cada una 3 ml de --- CO_3Na_2 anhidro al 12,5% y 0,5 ml de $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0,1%. Mezclamos y lo dejamos a 1 h. a temperatura ambiente. Después añadimos gota a gota y agitando continuamente 1 ml. de reac-

tivo de Folin-Ciocalteu diluido al 1/3 en H₂O destilada. --
Tras dejarlo 20 mn a temperatura ambiente, leemos las muestras en un espectrofotómetro (Coleman III) a 750 nm frente a un blanco conteniendo el diluyente en lugar del problema.

En algunas ocasiones, para no perder muestras hemos calculado la cantidad de protefna de la muestra midiendo la absorción a 280 nm en el espectrofotómetro.

III-1-6) MEDIDA DE LA DENSIDAD OPTICA:
=====

Las muestras diluidas en PBS eran leídas frente a un blanco de PBS en un espectro fotómetro Coleman III

El espectro de absorción de luz ultravioleta del Ag HB purificado fué determinado leyendo a intervalos de 5 nm desde 240 nm a 330 nm frente a un blanco de ClNa 0,15M.

III-1-7) MICROSCOPIA ELECTRONICA:
=====

En un microscopio TFSCA 242 se examinaron diluciones 1/50 de la preparación de Ag HB purificado, después de tinción negativa con ácido fosfotungstico al 2%, a 6.875 y 9.375 aumentos directos que representaban 34.375 y 46.875 aummentos finales respectivamente.

III-1-8) PURIFICACION DEL ANTIGENO HB:
=====

Debido a su elevado peso molecular, el Ag HB puede

ser separado de la mayor parte de las proteínas del suero por ultracentrifugación. Hemos comprobado que tras 16 h. de ultracentrifugación a 20.000 rpm. (68.400 g) ó 2 h. a 45.000 rpm. (222.000 g), el Ag HB queda depositado en el fondo del tubo, permaneciendo una buena parte de las proteínas del suero en el sobrenadante. Sin embargo, algunas de peso molecular alto sedimentan con él. Para eliminarlas pensamos en degradarlas por medios que no afectasen a la inmunoreactividad del Ag HB. Se había comprobado que éste es resistente al calor y a numerosos enzimas proteolíticos (Millman y cols. 1970; Kim y Bissell 1970). Tras probar ambos métodos, conseguimos mucho mejores resultados con el tratamiento enzimático con pepsina y tripsina. Ambas degradan las proteínas plasmáticas, sin afectar en absoluto el Ag HB la primera, y la segunda respetándolo - también siempre que no se haga un tratamiento demasiado intenso ni prolongado. Tratamientos alternativos con estas enzimas, seguidos de ultracentrifugación, para eliminar las proteínas degradadas, nos ha permitido obtener Ag HB de gran pureza.

El método definitivo que hemos adoptado en el laboratorio es como sigue:

1) Ultracentrifugación: Tomamos suero positivo para Ag - HB diluido 5 veces en PBS, y lo centrifugamos 16 h. a 68.400 g. El sedimento lo resuspendemos en PBS.

2) Ultracentrifugación: Repetimos la centrifugación a -- 68.400 g durante 16 h. Tomamos de nuevo el sedimento y lo resuspendemos ésta vez en tampón glicina (pH 2,8).

III - 2 - RESULTADOS

III-2-1) PURIFICACION:
=====

Una vez establecidas las condiciones que nos permiten lograr la purificación del Ag HB a partir del suero de portadores, iniciamos el tratamiento de una gran cantidad de suero. Después de cada uno de los 5 pasos, calculamos la cantidad de proteínas que nos quedan y las identificamos por inmunodifusión e inmunolectroforesis frente a suero de conejo anti-proteínas del suero humano y suero de conejo anti-HB.

1) Tomamos 120 ml. de suero muy positivo para Ag HB y lo diluimos en PBS hasta 600 ml. Centrifugamos a 68.400 g -- durante 16 h. obteniendo unos pellets que resuspendemos en un total de 30 ml. de PBS. Cantidad total de proteína: 300 mg.

Inmunodifusión e inmunolectroforesis frente a suero anti humano (SAH): Aparece una cierta cantidad de albúmina alfa 1-antitripsina, alfa 2-M, ceruloplasmina, haptoglobina, siderofilina e IgG (Fig. 3).

Inmunodifusión frente a suero anti-HB: Revela la presencia de Ag HB.

2) Nueva ultracentrifugación de la muestra a 68.400 g. durante 16 h. Resuspendemos en 7 ml.
Cantidad total de proteína: 187,2 mg.

Inmunoelectroforesis frente a SAH: Continúan apareciendo bandas de albúmina, alfa 2-M, haptoglobina, siderofilina, e IgG (Fig. 4).

Inmunodifusión frente a suero anti-HB: Presencia de Ag HB.

3) Tratamiento con pepsina seguido de ultracentrifugación 2 h. a 45.000 rpm. Resuspendemos en 7 ml.

Cantidad total de proteína: 76,75 mg.

Inmunoelectroforesis frente a SAH: No aparece ninguna línea de precipitación (Fig. 5).

Inmunodifusión frente a suero antihumano: Aparece una línea de precipitación (Fig. 6).

Inmunodifusión frente a suero anti-HB: Presencia de Ag HB.

4) Tratamiento con tripsina seguido de ultracentrifugación, Resuspendemos en 2 ml.

Cantidad total de proteína: 45 mg.

Inmunodifusión frente a SAH: No existe precipitación apreciable (Fig. 6).

Inmunodifusión frente a suero anti-HB: Línea de precipitación de antígeno HB.

5) Tratamiento con pepsina seguido de ultracentrifugación. Resuspendemos en 1,5 ml.

Cantidad de proteína: 28,2 mg/ml (total 42,3 mg).

Inmunodifusión frente a SAH: No se observa ninguna precipitación (Fig. 6).

Inmunodifusión frente a suero anti-HB: Línea de precipitación de HB. Si diluimos la muestra observamos una línea de precipitación hasta una dilución 1/1200 (23 mcgr/ml de pro-

tefna). Se observa una identidad total frente al Ag HB del suero del que partimos para la purificación. Esto permite afirmar que durante todo el proceso el Ag HB no ha sufrido ninguna modificación en su reactividad antigénica (Fig. 7).

III-2-2) MOVILIDAD ELECTROFORETICA;
=====

Por inmunoelectroforesis de la muestra en diversos estadios de la purificación así como de la muestra final del Ag HB purificado, frente a suero anti-HB se observa una línea de precipitación en la región alfa-2 que conserva la misma posición a lo largo de todo el proceso de purificación. (Fig. 8).

III-2-3) ESPECTRO DE ABSORCION DE LUZ ULTRAVIOLETA;
=====

El espectro de absorción de luz ultravioleta del AG HB purificado muestra un máximo a 280 nm y un mínimo a 260 nm, característico de una proteína. El cociente $OD_{260}/OD_{280} = 0,72$ va en contra de la presencia de ácidos nucleicos en nuestra muestra (Fig. 9).

III-2-4) MICROSCOPIA ELECTRONICA;
=====

En la muestra del antígeno HB purificado observamos un gran número de partículas esféricas de 20 nm de diámetro formando en ocasiones pequeños acúmulos y algunas partículas aisladas de forma tubular de 20 nm de diámetro y longitud variable. (Fig. 10 y 11).

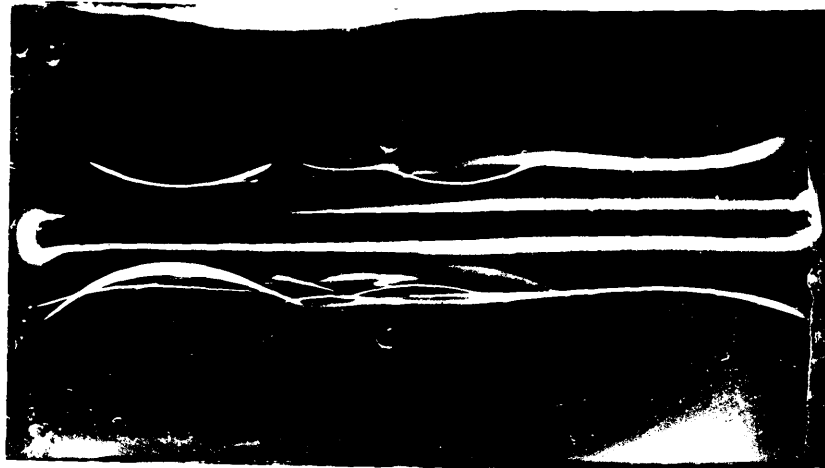


Fig. 3.- Purificación del Ag HB. Inmunoelectroforesis con SAH. Arriba: Material obtenido después - del primer paso. Se observan: Albúmina, alfa-1-antitripsina, alfa 2-M, ceruloplasmina, haptoglobina, siderofilina e IgG. Abajo: Suero del que se partió para la purificación.



Fig. 4.-Purificación del Ag HB. Inmunoelectroforesis con SAH. Arriba: Suero antes de comenzar la purificación. Abajo: Material obtenido después del segundo paso. Se observa aún algo - de albúmina, alfa 2-M, haptoglobina, sidero- filina e IgG.



Fig. 5: Purificación del Ag HB. Immunoelectroforesis con SAH. Arriba: Suero humano antes de comenzar la purificación. Abajo: Material obtenido después del tercer paso. No se observan ya líneas de precipitación.



Fig. 6: Purificación del Ag HB. Inmunodifusión. Arriba: SAH. Izquierda: Material obtenido después del tercer paso. Se observa una precipitación con el SAH. Abajo y Derecha: Material obtenido después del cuarto y quinto paso respectivamente. No existe precipitación apreciable entre estas muestras y el SAH.

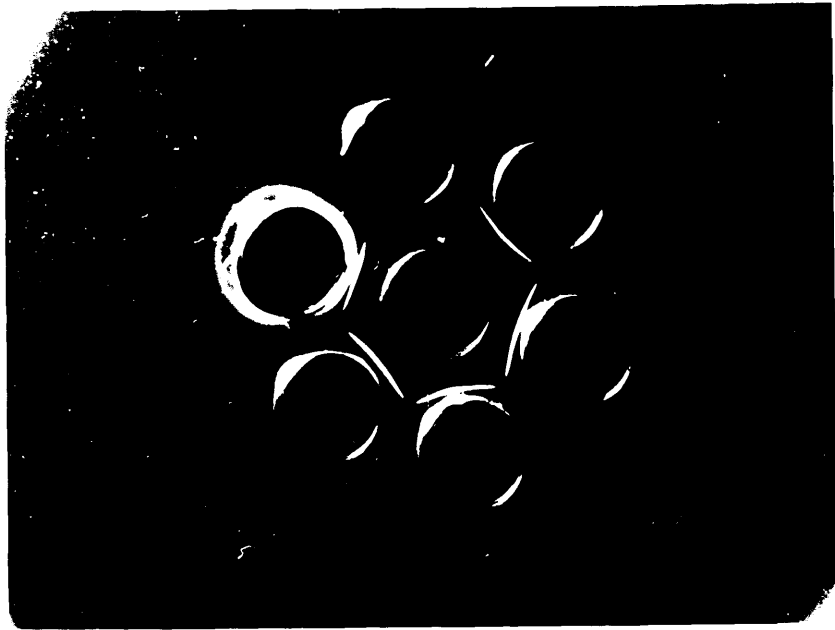


Fig. 7: Inmunodifusión con antisuero Au/SH.
1: Suero del que se partió para la purificación.
2,3,4,5 y 6: Diluciones 1/80, 1/160, 1/300, 1/1200
de la muestra de Ag HB purificado.
Todas las muestras dan una línea de precipitación
con el antisuero. La identidad entre el Ag HB del
suero y el purificado es total.



Fig. 8: Inmunolectroforesis con antisuero Au/SH.
Arriba: Muestra de Ag HB después del tercer paso
de la purificación. Abajo: Muestra de Ag HB al -
final del proceso de purificación.

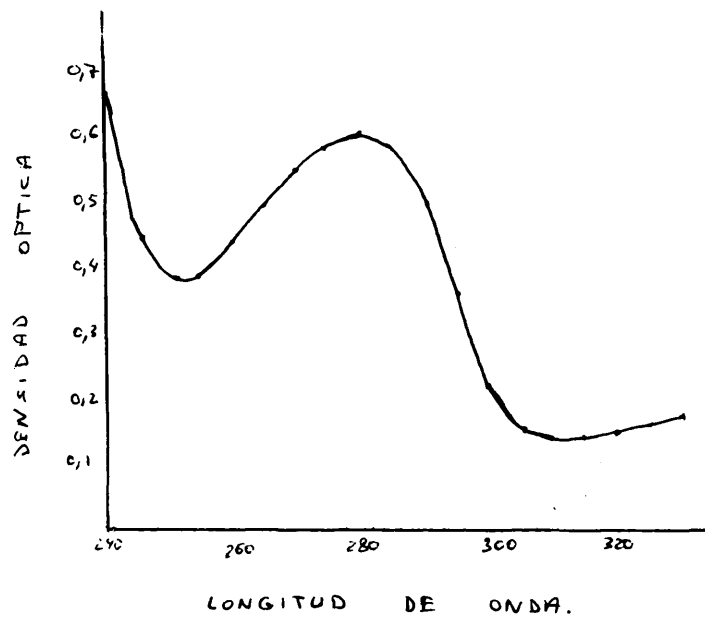
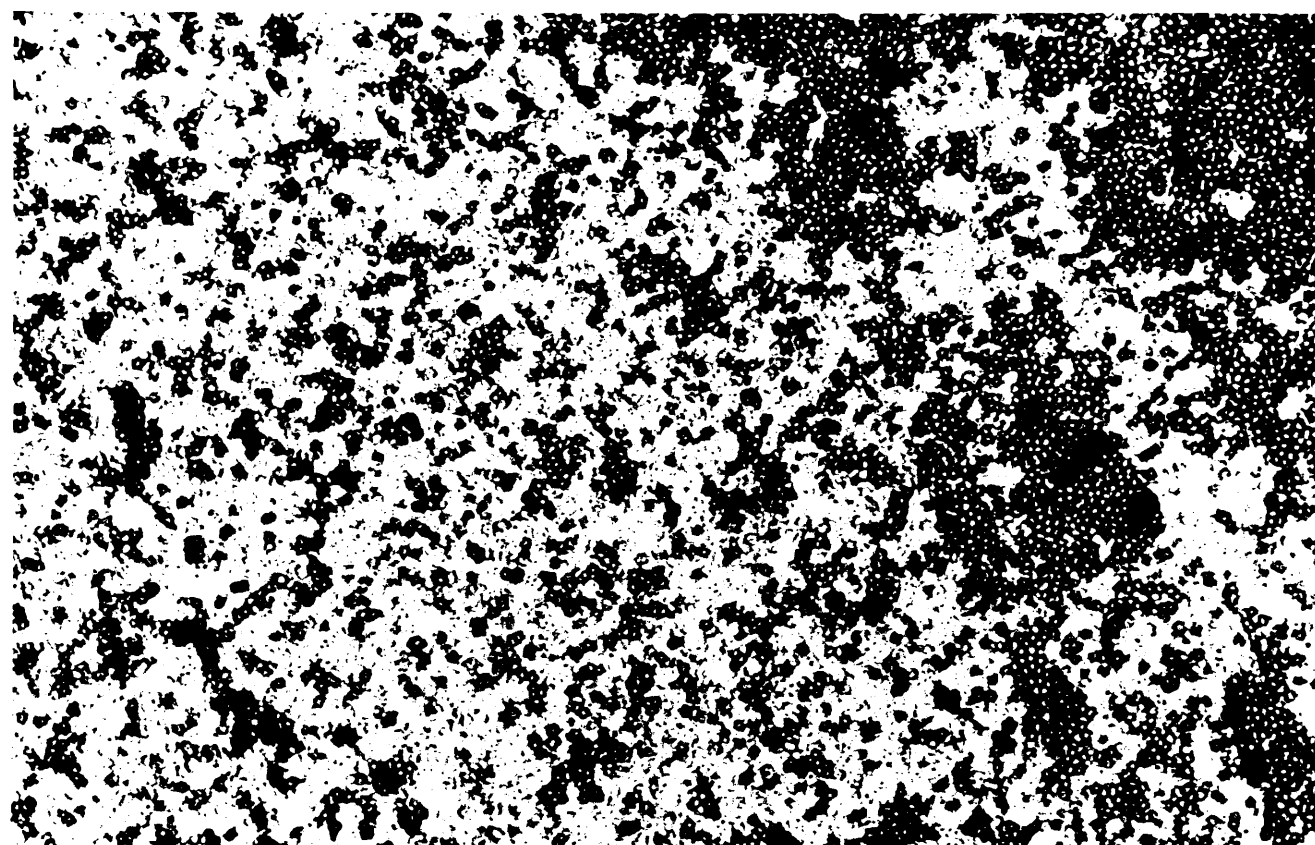
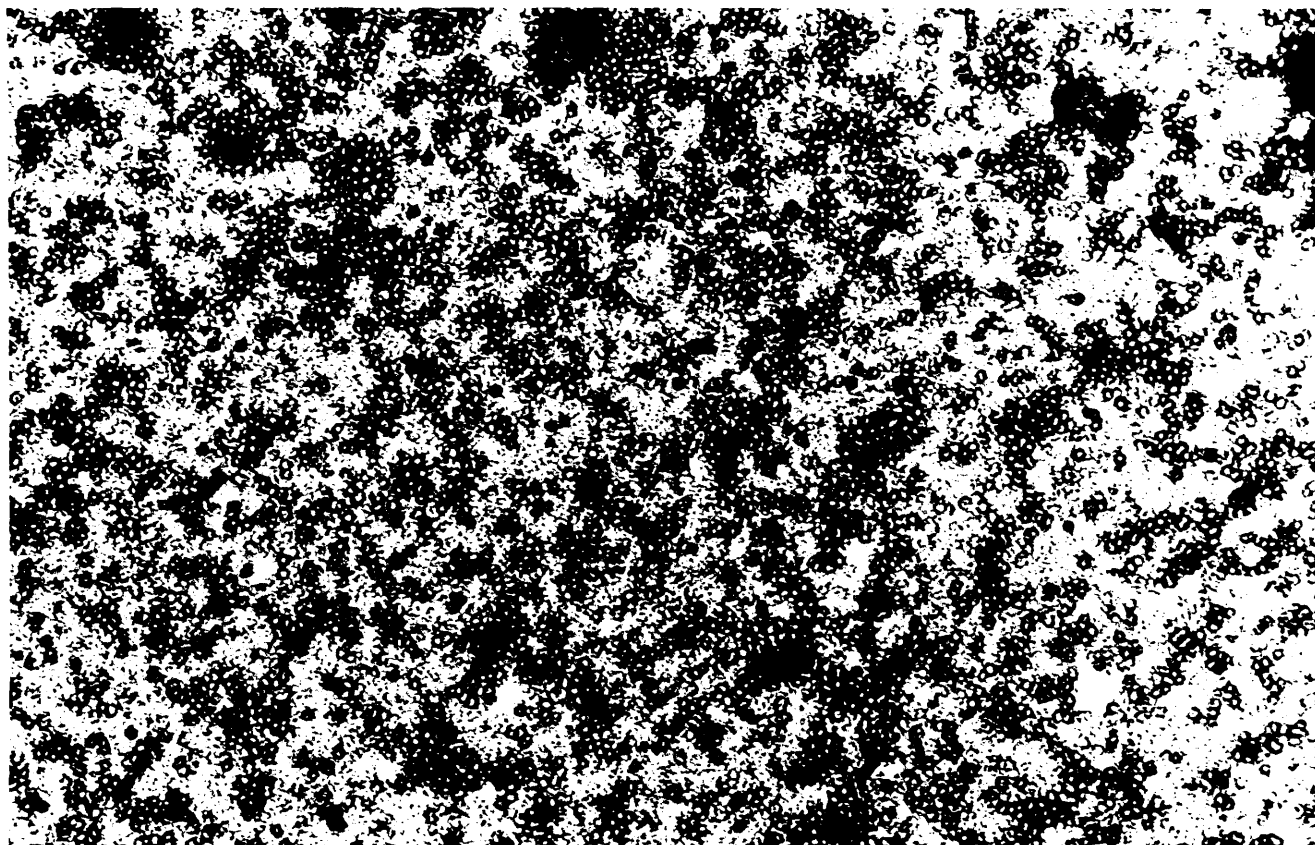


Fig. 9.- Espectro de absorción de luz ultravioleta de la muestra de Ag HB purificado. Máximo a 280 nm., mínimo 260 nm. Cociente 260/280:0,72.



Figs. 10 y 11.- Muestra de Ag HB purificado diluida al 1/50
observada al microscopio electrónico x 34.375.

III - 3 - D I S C U S I O N

III-3-1) PURIFICACION:

=====

La resistencia del Ag HB frente a algunos enzimas - ya había sido descrita e incluso esta propiedad había sido - utilizada para su purificación (Millman y cols. 1970). Sin - embargo el tratamiento empleado era suave y sólo lograba una desnaturalización parcial de las proteínas del suero, por lo que la purificación debía completarse con la centrifugación en gradientes. Nosotros al probar diversos enzimas observamos que la pepsina, que no había sido utilizada previamente en - la purificación del Ag HB, era el que proporcionaba mejores resultados, pues era muy activa frente a las proteínas plas - máticas y no afectaba en absoluto al Ag HB incluso tras tra - tamientos prolongados (18 h.) a 37°C y pH 2,8.

La tripsina también se muestra muy útil, pero si la relación enzima/sustrato es demasiado elevada o el tiempo - de incubación superior a dos horas, produce una desnaturali - zación parcial del Ag HB.

Alternando el tratamiento con estos dos enzimas con ultracentrifugaciones conseguimos la eliminación total de - las proteínas plasmáticas con los sobrenadantes conservando el Ag HB en el sedimento.

Evitamos por tanto tener que utilizar gradientes de ClCs o sacarosa, lo que supone una simplificación considerada

ble del proceso.

Rendimiento:

El rendimiento es muy bueno pues partimos de 120 ml de suero positivo por inmunodifusión frente a anti-HB hasta una dilución de 1/16 y obtenemos 1,5 ml. de muestra, positiva -- hasta una dilución de 1/200.

Pureza:

Los criterios de pureza utilizados son mucho más estrictos que los de la mayoría de los autores. En efecto comprobamos por inmunodifusión la ausencia de proteínas del -- suero en una muestra 1.200 veces más concentrada que la mínima que da una línea de precipitación frente a suero anti-HB. Millman y cols. (1970) por el contrario no prueban a -- concentrar o diluir su muestra y Vyas y Shulman (1970) sólo comprueban la ausencia de precipitación frente a suero anti humano en una muestra 20 veces más concentrada que la mínima que reacciona por inmunodifusión frente a suero anti-HB.

Otros autores utilizan la electroforesis en gel de -- poliacrilamida (Gerin y cols. 1971; Kim y Tilles 1973) técnica muy sensible para proteínas por debajo de cierto tamaño, pero inútil para detectar algunas macroglobulinas, proteínas agregadas o el propio Ag HB que no pueden penetrar en el gel. O también la inmunolectroforesis (Gerin y cols 1971) mucho menos sensible que la inmunodifusión como se ha podido ver -- durante nuestro proceso de purificación.

La identidad, comprobada por inmunodifusión, del Ag HB purificado con el contenido en el suero del que partimos para la purificación, la movilidad electroforética, la cur-

va de absorción de luz ultravioleta y la morfología observada con el microscopio electrónico, iguales a las encontradas en el Ag HB purificado por otros autores (Millman y cols. -- 1970; Gerin y cols. 1971) confirman la resistencia del Ag HB al tratamiento empleado para su purificación.

III-3-2) MOVILIDAD ELECTROFORETICA;

=====

Emigra con las alfa-2 globulinas como ya observaron otros autores (Alter y Blumberg 1966; Millman y cols. 1970).

III-3-3) ESPECTRO DE ABSORCION ULTRAVIOLETA;

=====

Los ácidos nucleicos tienen un máximo de absorción a 260 nm. La curva que hemos obtenido indica que en nuestra preparación (es decir en las partículas esféricas de 20 nm y en las tubulares) no existe una cantidad apreciable de ácidos nucleicos. Esto está de acuerdo con la teoría, hoy día - muy admitida, de que estos dos tipos de partículas constituirían material proteico de recubrimiento del virus, y que éste sería el núcleo central de las partículas de Dane (Ver -- I-6).

IV - ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA AL Ag HB.
=====

IV - 1 - MATERIALES Y METODOS.-

Como objeto de este estudio se tomaron los siguientes grupos de sujetos:

- sujetos sanos.
- Enfermos con hepatopatías crónicas.
- Enfermos crónicos no hepáticos.
- Enfermos con insuficiencia renal terminal en programa de hemodiálisis periódicas.
- Donantes retribuidos del banco de sangre.
- Personal sanitario trabajando en zonas de alto riesgo de infección por el virus de la hepatitis B.
- Familiares de enfermos hepáticos con Ag HB crónicamente positivo.
- Enfermos con hepatitis agudas tipo B.

SUJETOS SANOS.-

Se tomaron como tales personas que acudían a consulta a la Fundación Jiménez Díaz por primera vez y en los que -- tras su estudio se descartaba cualquier enfermedad, o eran diagnosticados de procesos funcionales, comprobándose que -- no existían signos, síntomas, o datos bioquímicos que indicaran un posible daño hepático, o algún proceso relacionado con alteraciones en la inmunidad. También se exigía que en

su anamnesis no figurasen transfusiones de sangre, ingresos prolongados en hospitales, historia previa de hepatitis o intervenciones quirúrgicas importantes (se han aceptado personas apendicectomizadas o amigdalectomizadas).

En total se han estudiado 45 sujetos (23 hembras y 22 varones) con edades comprendidas entre los 11 y los 76 años (edad media 39,4). De ellos, 16 tenían entre 10 y 29 años, 15 entre 30 y 49 años y 14 por encima de 50 años.

ENFERMOS CON HEPATOPATIAS CRONICAS.-

Se han tomado aquellos enfermos en los que el diagnóstico no ofrecía dudas, la gran mayoría de ellos con estudio laparoscópico y biopsia hepática, (realizado por el Dr. Hernández Guio del Servicio de Gastroenterología). En total se trata de 72 enfermos (60 varones y 12 hembras) con edades comprendidas entre los 5 y los 78 años (media 50 años). Estos enfermos fueron subdivididos así:

Hepatitis crónica persistente (H.C.P.): 15 casos (todos varones), todos ellos biopsiados. Edades entre 5 y 67 años (media 42,2)

Hepatitis crónica agresiva (H.C.A.): 31 casos (22 varones y 9 hembras). En todos los casos el diagnóstico fué hecho por biopsia. Edades entre 28 y 71 años (media 52,2).

Cirrosis: 26 casos. En 20 de ellos el diagnóstico fué hecho por laparoscopia y/o biopsia y en los 6 restantes se hizo por la clínica y los datos analíticos. 23 eran varones y 3

hembras. Las edades estaban comprendidas entre 28 y 78 años.
(media 52 años.

ENFERMOS CRONICOS NO HEPATICOS.-

Se tomaron aquellos enfermos con procesos de más de un año de evolución y repetidos ingresos en la clínica, pero sin antecedentes ni datos actuales de padecimiento hepático.

En total se estudiaron 26 enfermos: 17 con procesos respiratorios (tuberculosis, bronquitis crónica, asma) 5 cardiacos (válvulopatías), 3 vasculares (hipertensión y arteriosclerosis) y 1 reumático (artrosis). 16 eran varones y 10 hembras y las edades comprendidas entre los 17 y los 69 años (media 47,6).

ENFERMOS EN PROGRAMA DE HEMODIALISIS.-

Estudiamos un total de 32 enfermos que han pertenecido al programa de hemodiálisis periódicas del Departamento de Nefrología. 22 fueron estudiados por primera vez en Junio de 1973 (antes de que apareciera ningún enfermo Ag HB positivo en la unidad) y el resto en los meses siguientes, en general poco después de ser incluidos en el programa. 29 han sido estudiados en repetidas ocasiones durante periodos de tiempo comprendidos entre 2 y 12 meses. De ellos 12 son hembras y 20 varones. Las edades están comprendidas entre los 17 y los 57 años (media 33,5).

DONANTES DE SANGRE.-

Todos los donantes del banco de sangre de la Fundación son retribuidos. Tras la extracción, el AgHB se determi

na por Inmunoelectrosmoforesis.

La frecuencia de positividades es del 0,86% (J. Serrano Glez.-Solares 1972). Nosotros estudiamos 92 donantes AgHB negativo y 21 Ag HB positivo, en este último grupo sólo incluimos aquellos en que pudimos confirmar por ID la presencia de Ag HB (evitando así algún posible falso positivo). La mayoría comprendidos entre los 18 y los 30 años.

PERSONAL TRABAJANDO EN ZONAS DE ALTO RIESGO Y OTROS LABORATORIOS.-

Se han considerado zonas de elevado riesgo de contagio del virus de la hepatitis B las siguientes:

Departamento de Inmunología: Donde se determina el Ag HB de rutina y donde en los dos últimos años se ha realizado este trabajo.

Unidad de diálisis: Dada la frecuencia en la que en estas unidades aparecen epidemias de hepatitis B y la facilidad con la que los enfermos en insuficiencia renal se convierten en portadores crónicos del Ag HB.

Laboratorio de Nefrología: Donde se realizan determinaciones analíticas a los enfermos del departamento y en particular a los de la unidad de diálisis.

Departamento de Hematología: Donde se maneja gran cantidad de sangre, entre otros de enfermos que con frecuencia son portadores del Ag HB (especialmente leucémicos y algunos donantes de sangre).

Hemos estudiado un total de 30 miembros de estos departamentos distribuidos como sigue:

- 10 del Departamento de Inmunología.
- 12 de la Unidad de diálisis.
- 3 del Laboratorio de Nefrología.
- 5 del Departamento de Hematología (2 pertenecientes al banco de sangre.).

También se han estudiado 19 miembros del departamento de Microbiología, zona teóricamente considerada como de menor riesgo.

Once de estas personas han sido estudiados en más de una ocasión y a todos se les ha seguido clínicamente buscando posibles síntomas de hepatitis aguda.

FAMILIARES DE ENFERMOS CON Ag HB CRONICAMENTE POSITIVOS.-

De las 1.829 determinaciones de Ag HB realizadas en el Departamento de Inmunología entre Octubre de 1.972 y Julio de 1.974, aparecieron 149 enfermos con Ag HB positivo. De ellos 52 (39 varones y 13 hembras) se consideraron crónicamente positivos (considerándose así cuando el Ag HB era positivo en todas las determinaciones realizadas, y siempre que el tiempo transcurrido entre la primera y la última fuera superior a tres meses).

Logramos estudiar un total de 32 (14 varones, 18 hembras) familiares de 14 (12 varones y 2 hembras) de estos portadores crónicos.

Sólo se aceptaron para el estudio aquellos familiares

que convivían en la misma casa que el enfermo. El mayor número de familiares de un solo enfermo que se consiguió estudiar fué de 7 y el menor de 1. En muchas de estas familias solo se consiguió estudiar a alguno o algunos de los miembros que convivían en la misma casa. Por su parentesco con el enfermo estos familiares se distribuían así:

Padres	5	Esposos	10	Primos	2
Hijos	2	Hermanos	3	Hijos	10

ENFERMOS CON HEPATITIS AGUDAS TIPO B.-

Se han incluido en este apartado solo aquellos enfermos que han presentado aumento significativo de la TGO acompañado de Ag HB positivo.

En total hemos estudiado 44 enfermos con estas características, con edades comprendidas entre los 18 y los 88 años (media 37,7). De ellos 26 son hembras y 18 varones. Estos enfermos se han clasificado en 3 grupos:

A) Enfermos en programa de hemodiálisis periódicas en el Departamento de Nefrología de la Fundación:

Hemos estudiado los once enfermos que en los últimos dos años han desarrollado hepatitis agudas tipo B. Sus edades oscilaban entre los 25 y los 57 años (media 36,5). De ellos 7 eran varones y 4 hembras).

B) Enfermos transplantados: Aquellos que en el momento de presentarse la hepatitis habían sido ya transplantados y su riñón era funcionante.

Estudiamos 3 de estos enfermos, con edades comprendidas entre los 19 y los 28 años (media 23,3). De ellos 2 --- eran hembras y uno varón).

C) Otros enfermos: La mayoría de ellos acudieron a consulta a la Fundación por su proceso hepático, aunque algunos estaban siendo vistos por otros procesos cuando desarrollaron la hepatitis.

Estudiamos 30 de estos enfermos, con edades comprendidas entre los 88 y los 18 años (media 39,6). De ellos 20 -- eran hembras y 10 varones

Todos estos enfermos fueron estudiados durante periodos de tiempo comprendidos entre los 1 y 12 meses.

IV-1-2) DETERMINACION DE LOS Ac HB:

=====

En todos los sueros la determinación fué realizada simultáneamente por el método de doble difusión ya descrito (III-1) y por hemaglutinación pasiva (H.A.P.).

METODO DE HEMAGLUTINACION PASIVA

Dada la enorme sensibilidad de los métodos de aglutinación comparados con los de precipitación, se han ideado numerosos procedimientos para recubrir partículas (hematíes, partículas de latex) con antígenos y poder así extender el método a numerosos sistemas antígeno-anticuerpo. Los hematíes absorben sobre su superficie algunos polisacáridos, y tras -

modificar su superficie con ácido tánico o cloruro crómico, o por unión química mediante bencidina bisdiazotizada o glutaraldehído, también pueden ser recubiertos por proteínas. - Aunque el método más utilizado es el del ácido tánico, JANDL y SIMMONS, 1957, mostraron que la sensibilización de los hematíes también puede hacerse con ácido crómico, siendo este procedimiento mucho más rápido y extremadamente sensible --- (POSTON, 1974). Posteriormente algunos autores lo utilizaron para pruebas de hemaglutinación pasiva con diversos antígenos proteicos (GOLD y FUDENBERG, 1967, VYAS y cols. 1968), -- siendo VYAS y SHULMAN (1970) los primeros en utilizarlo para recubrir hematíes con Ag HB. Recientemente FAULK y HOUDA -- (1973) han mostrado la utilidad de este método de recubrimiento de hematíes para numerosas técnicas inmunológicas, y POSTON (1974) ha propuesto la utilización de piperazina como -- buffer, consiguiendo así una mayor estabilidad de reacción.

En esencia consiste en incubar hematíes con el antígeno y una solución débil de CrCl_3 . Después de lavados, estos hematíes "sensibilizados" son puestos en contacto con el suero problema, apareciendo una aglutinación si éste contiene anticuerpos específicos para el antígeno utilizado. El método por nosotros empleado es como sigue:

Materiales.-

Hematíes humanos grupo O: Se preparan a partir de - sangre heparinizada. Esta es centrifugada durante 7 mn a 3.000 rpm., eliminando el plasma y la capa de leucocitos. Los hema

tes se lavan 3 veces en ClNa 0,15M, centrifugando después de cada lavado 3 mn a 3.000 rpm. para eliminar el sobrenadante. Los hematíes así obtenidos se diluyen al 40% en ClNa 0,15M. Deben de ser conservados a 4° y utilizados frescos o dentro de las primeras 48 h.

Antígeno: Utilizamos el Ag HB purificado por nosotros (III) a una concentración de 94 microgramos/ml en ClNa 0,15 M. Puede conservarse durante largo tiempo a -20° C y al menos durante meses a 4°C.

Cloruro crómico: $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (B.D.H. Analar). Preparamos una primera solución 0,0375M en agua destilada. Se utiliza una dilución al 1/80 de esta primera en ClNa 0,15M. Esta dilución debe ser utilizada poco después de preparada y no puede ser conservada.

P.B.S.: ver III.

Suero de conejo normal (SCN): Obtenido en el laboratorio. Conservado a -20°.

Método.-

La reacción se hace en un tubo de 10 ml. donde añadimos:

- 0,3 ml. de hematíes humanos grupo 0 diluidos al 40%.
- 0,6 ml. de Ag HB a una concentración de 94 microgramos/ml.

Después de mezclar, agitando suavemente añadimos:

- 0,6 ml. de CrCl_3 (dilución al 1/80 de solución 0,0375M).

La mezcla es agitada suavemente durante 5 mn al cabo de los cuales paramos la reacción añadiendo ClNa 0,15 M con SCN 1/500, centrifugando a 1300 rpm. en una centrífuga MSE a 4°C

durante 4 mn. Es importante no centrifugar las células en exceso para evitar su aglutinación. Finalmente los hematíes sensibilizados son conservados al 2% en PBS con SCN al 1/1000 en nevera a 4°, pudiendo ser utilizados durante 3-4 días.

El test de hemaglutinación se realiza en placas de perspex del M.R.C. Se hacen diluciones seriadas del suero problema en PBS con SCN 1/1000, comenzando por 1/3, de forma que cada una tenga una concentración triple de la siguiente (1/9, 1/27, etc.). La pequeña cantidad de SCN que ponemos es necesaria para que en los negativos los hematíes sedimenten en el fondo del pocillo.

Utilizamos 0,5 ml. de la dilución del suero problema y 0,05 ml. de la suspensión de hematíes sensibilizados. Después de una agitación suave, dejamos reposar a temperatura ambiente, realizando la lectura al cabo de 2 horas.(Fig.12)

También hemos probado a hacer la reacción de hemaglutinación en placas de microaglutinación (COOKE engineering Co), poniendo 0,05 ml. de la dilución del suero problema y 0,025 ml. de la suspensión de hematíes sensibilizados. Comparando con un mismo suero ambos sistemas, este último nos daba títulos nueve veces menores (2 diluciones del suero). Este resultado resulta lógico, considerando que la cantidad del suero problema que utilizamos es proporcionalmente menor. Probamos entonces a diluir más los hematíes sensibilizados para restablecer la proporción antisuero-hematíes; con ello aumentamos algo la sensibilidad del micrométodo, pero dado

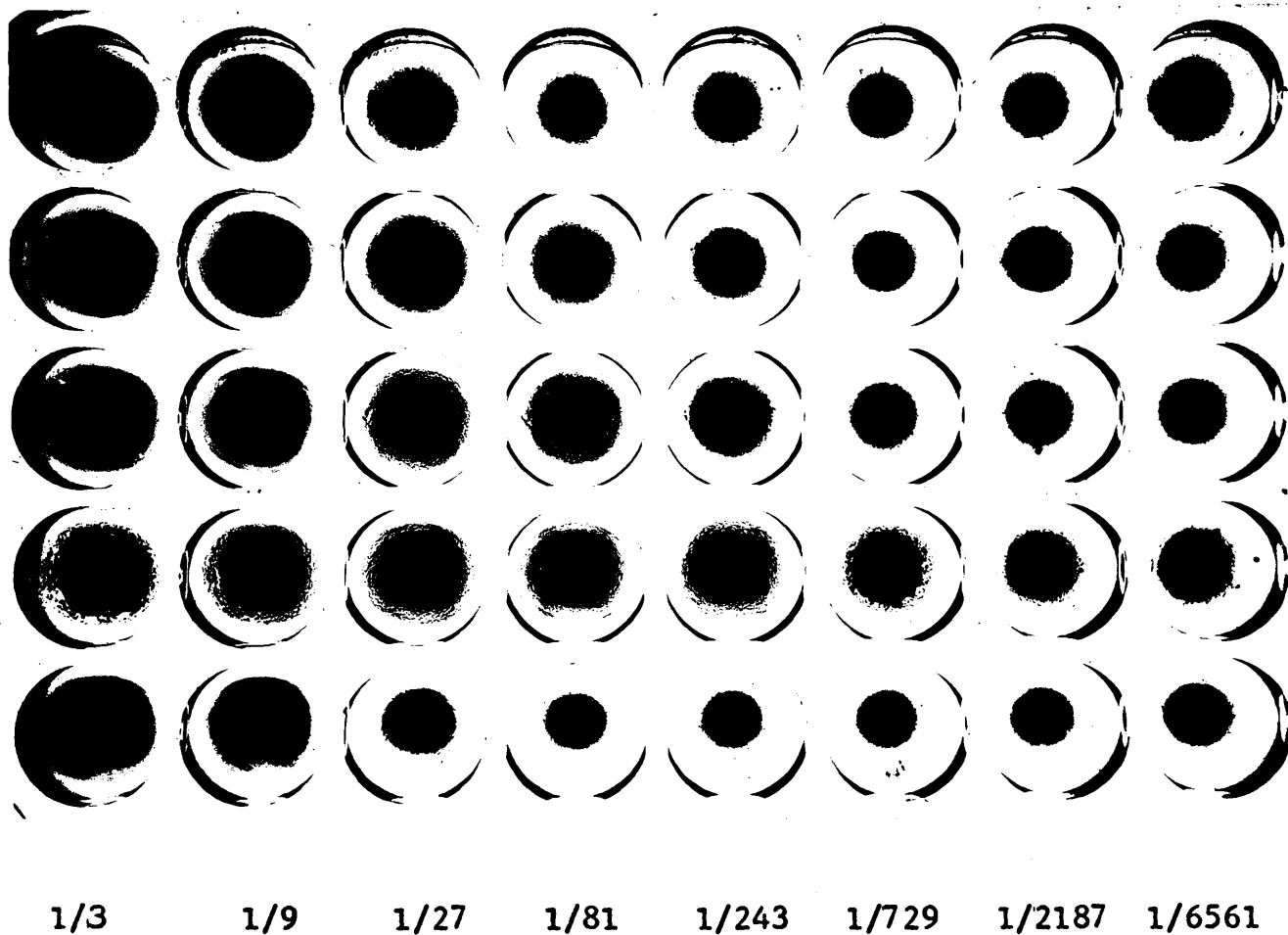


Fig. 12.- Prueba de hemaglutinación pasiva en placas del M.R.C.
Diluciones sucesivas (entre 1/3 y 1/6561) de 5 sueros.
Primer suero: título 1/9
Segundo suero: título 1/81.
Tercer suero : título 1/243
Cuarto suero: título 1/2187. En el último pocillo también
existe una aglutinación muy ligera, pero no
fué considerada significativa.
Quinto suero: Título 1/9.

que los resultados eran inferiores a los conseguidos con las placas de Perspex del M.R.C., adoptamos definitivamente éstas, aunque ello supusiera un mayor gasto de reactivos.

Para establecer las concentraciones óptimas de Ag HB y CrCl_3 necesarias para sensibilizar los hematíes (ver VYAS y cols. 1968), probamos las diluciones 1/20, 1/40, 1/60, 1/80 y 1/100 de la solución 0,0375M de CrCl_3 con diluciones 1/200, 1/300, y 1/400 de nuestra muestra concentrada de Ag HB (conteniendo 28,2 mg/ml) y que corresponden a 141 microgramos por ml., 94 microgramos/ml. y 70,5 microgramos/ml. respectivamente. Con ellas titulamos un suero de conejo anti Au/SH comercial (Behringwerke) (tabla 3).

Cl_3Cr 0,0375M.

		1/20	1/40	1/60	1/80	1/100
AgHB 28 mg/ /ml.	1/200	Aglut.	Aglut.	1/2187	1/19683	0
	1/300	Aglut.	Aglut.	1/6561	<u>1/59049</u>	0
	1/400	Aglut.	Aglut.	1/19683	1/ 2187	0
	0	Aglut.	Aglut.	Aglut.	0	0

Tabla 3: Pruebas para determinar la concentración óptima de Ag HB y de Cl_3Cr para recubrir los hematíes.

Observamos que las concentraciones óptimas corresponden a Cl_3Cr diluido 1/80 (0,47mM) y Ag HB diluido 1/300 (94 microgramos/ml.) que proporcionan un título de 1/59.049, siendo los controles negativos. Vemos que si aumentamos la concentración de Cl_3Cr llega a aparecer una aglutinación espontánea, mientras que si la disminuimos, la sensibilización no se produce. Tanto si aumentamos como si disminuimos la concentración de Ag HB, los títulos obtenidos son inferiores.

El mismo antisuero comercial utilizado para estas pruebas sirvió para comprobar con cada nuevo lote de hematíes si la sensibilización había sido correcta.

Como controles empleamos hematíes sensibilizados con PBS y hematíes sin sensibilizar con la dilución más concentrada de los sueros problema (1/3) y con PBS.

IV-1-3) DETERMINACION DEL Ag HB.-

=====

Se realizó en todos los casos, utilizando el método de doble difusión ya descrito (III-1). Se valoró entre una y tres cruces (†) según la intensidad de la precipitación.

Se intentó también la determinación de Ag HB por inhibición de la hemaglutinación (Vyas y Shulman 1970). Se utilizaron los mismos hematíes sensibilizados empleados en el test de hemaglutinación pasiva (ver IV-1) y diluciones sucesivas del antisuero control anti Au/SH de conejo comercial (Behringwerke). A 0,5 ml. de estas diluciones colocadas en los pocillos de las placas de perspex añadíamos 0,05 ml. del sue-

ro problema. Como control utilizábamos las diluciones de antisuero más 0,05 ml. de solución salina. Si el suero problema contenía Ag HB éste se combinaría a los Ac HB, descendiendo el título del antisuero comercial.

Sin embargo esta técnica no dió buenos resultados pues las proteínas que contenían los sueros eran capaces de interferir con frecuencia en la hemaglutinación. Solo si diluíamos considerablemente los sueros problema obteníamos resultados claros, pero entonces la sensibilidad del método era pequeña. Por ello este método fué empleado solo para ver la inhibición de la hemaglutinación con preparaciones purificadas de AgHB, antes y después de calentadas, estudiando así la resistencia del antígeno al calentamiento. Estas preparaciones purificadas al contener una concentración muy baja de proteínas no interferían la hemaglutinación.

Para determinar el Ag HB por inhibición de la hemaglutinación probamos también a añadir a 0,5 ml. de diluciones sucesivas del suero problema, una cantidad constante de antisuero anti Au/SH comercial (aquella que a la dilución que quedaba en el pocillo daba un título de 1/5). Sin embargo aquí también tuvimos problemas por lo que abandonamos el método.

Estas dificultades en la determinación del Ag HB por inhibición de la hemaglutinación pasiva, también han sido encontradas por la mayoría de los autores, sin embargo emplean con éxito el test de HAP para determinar Ac HB (Ashcavai y Peters 1973).

IV-1-4) ESTUDIO DE LA CLASE DE ANTICUERPOS.-

=====

En el suero los anticuerpos IgM se presentan como pentámeros, mientras que los IgG se hallan como monómeros. La capacidad aglutinante de la IgM es muy superior a la de la IgG por su mayor valencia, pero desaparece totalmente si se la reduce a monómeros.

Para saber si la aglutinación producida por los sueros era debida a anticuerpos específicos de la clase IgM o IgG, decidimos tratarlos con un agente reductor, el 2-Mercaptoetanol, en una concentración 0,05M que reduce el 90-95% de la IgM a monómeros sin romper la IgG (como se comprueba por filtración por Sephadex G-200). A continuación evitamos la repolimerización de los monómeros de IgM por alquilación con yodoacetamida.

Materiales.-

- 2-Mercaptoetanol (Eastman organic chemicals) solución 1M.
- Yodoacetamida (B.D.H.) $\text{CH}_2\text{I} \cdot \text{Co} \cdot \text{NH}_2$. Solución 0,5M preparada en el momento del uso.

Método.-

En un tubo de 10 ml. introducimos:

- suero problema: 0,95 ml.
- 2 ME: 0,05 ml. de la solución 1M.

Incubamos durante dos horas en un baño a 37°C. A continuación y en un baño a 4°C, añadimos 0,1 ml. de la solución 0,5M de

yodoacetamida. Después de dejarlo algún tiempo a 4°C, hacemos diluciones determinando el título por hemaglutinación pasiva. Simultáneamente determinamos el título del suero -- sin reducir.

La presencia de 2 ME y yodoacetamida hace que no sean valorables las reacciones de la muestra sin reducir y a una dilución 1/3, pero no parece afectar la hemaglutinación a diluciones mayores

IV-1-5) ESTUDIO DE LA INMUNIDAD CELULAR

=====

Pueden utilizarse diversos métodos para valorar la existencia de inmunidad mediada por células contra antígenos específicos de virus. El más sencillo, las pruebas "in vivo" por inoculación del antígeno en la piel del sujeto, no pueden ser empleadas con el Ag HB dado su poder patógeno. De las pruebas "in vitro" de inmunidad celular, las pruebas de citotoxicidad están comenzando a ser empleadas para antígenos virales (STEELE y cols. 1973, DOHERTY y ZINKERNAGEL, 1974), pero tienen el inconveniente en nuestro caso de la dificultad de cultivar el virus de la hepatitis B.

Nos quedaban pues como posibles el estudio de la producción de MIF (factor inhibidor de la migración) y la transformación blástica de los linfocitos. Se ha visto que la primera se correlaciona mejor que la segunda con la hipersensibilidad tardía tanto con antígenos virales como no virales (DAVID y SCHLOSSMAN 1968; SENYK y cols. 1971) por lo que decidi-

mos emplearla.

RICH y LEWIS, en 1928, fueron los primeros en observar que un antígeno (la tuberculina) inhibía la migración de células de animales con hipersensibilidad tardía a ese mismo antígeno. Desde entonces, se ha venido empleando este método "in vitro" para poner de manifiesto la inmunidad celular en animales. En 1962, GEORGE y VENGHAN mejoraron técnicamente el método al introducir el uso de capilares y DAVID (1964 a,b) precisó las condiciones necesarias. Años más tarde, al demostrarse que el MIF puede actuar sobre macrófagos de especie diferente de la de las células que lo han producido, se desarrolló un sistema mediante el cual se cultivaban linfocitos humanos con y sin antígeno, probando la existencia de MIF en los sobrenadantes utilizando macrófagos de cobarde como mediadores (THOR y cols. 1968, ROCKLIN y cols. 1970). Sin embargo, este test es laborioso por el manejo de los sobrenadantes, quedando muy simplificado al demostrar SOBORG y BENDIXEN (1967) que pueden ser utilizados los leucocitos humanos de sangre periférica como células indicadoras. CLAUSEN, en 1971, ideó la utilización de placas de agarosa en lugar de capilares, con lo que aumentaba la sensibilidad del método a la vez que se necesitaba menor número de leucocitos y menos cantidad de antígeno. Recientemente ha precisado numerosos detalles del método (CLAUSEN, 1973, a,b,c,d,e). ASTOR y cols. (1973) demostraron que los resultados de este test se correlacionan bien con las pruebas cutáneas con di-

versos antígenos (PPD, Candida y Estreptoquinasa-estreptodornasa).

El método consiste en esencia en aislar leucocitos de la sangre periférica del enfermo, y una vez lavados, incubarlos en el medio de cultivo con y sin antígeno durante media hora. Entonces son introducidos en pocillos en una placa con agarosa y medio de cultivo. A las 18 horas se observa una migración a partir del pocillo, midiéndose y comparándose el área de migración de los leucocitos incubados con y sin antígeno.

Nosotros lo empleamos como sigue:

Materiales.-

- Dextrano T 250 (Pharmacia): Al 6% en ClNa 0,15M.
- Bicarbonato sódico: CO_3HNa (Merck). Solución con 140 mg/ml. en agua destilada (0,16M).
- Penicilina 6600 U/ml. † Estreptomina 6,6 mg/ml.
- Suero de caballo (GIBCO)
- Medium 199 concentrado x 10 (BDH)
- Agarosa para electroforesis (BDH)
- Azul tripan (Gurr's): Solución al 0,5% en PBS
- Solución de Hank: Se prepara en el momento de su empleo, mezclando a partes iguales dos soluciones (A y B que pueden ser conservadas en nevera) diluyendo la mezcla 10 veces en agua destilada y añadiendo 3,4 mg/ml. de bicarbonato.

Sol. A:

ClNa (Merck).....	160 mg/ml.
ClK (Merck).....	8 mg/ml.
SO ₄ Mg7H ₂ O (Merck).....	2 mg/ml.
Cl ₂ Mg.6H ₂ O (Merck).....	2 mg/ml.
Cl ₂ Ca (Merck).....	2,8 mg/ml.

en agua destilada.

Sol. B:

PO ₄ HNa ₂ .12H ₂ O (Merck).....	3,04 mg/ml.
PO ₄ H ₂ K (Merck).....	1,2 mg/ml.
Glucosa.....	20 mg/ml.

en agua destilada

- Material de vidrio (tubos, pipetas, etc.) siliconizado y de plástico (placas de Petri, tubos, etc.)

Debe trabajarse en condiciones estériles.

Método.-

Preparación del medio de agarosa: Se prepara cada día para ser utilizado en fresco. Una solución de agarosa al 1% en agua destilada se esteriliza en autoclave. Cuando se ha enfriado a una temperatura de 47°C, se añade Medio de cultivo 199 para una concentración final de x 1, suero de caballo para 10%, bicarbonato sódico 375 microgramos/ml, Penicilina 66 U/ml. y Estreptomitina 66 microgramos/ml. Esto proporciona un pH de 7,2-7,4 después de incubado en atmósfera de aire.

En placas de Petri estériles de plástico de 85 mm. de diámetro se vierten 10 ml. de esta mezcla y se deja so

lidificar en posición estrictamente horizontal. Con un sacabocados hacemos 8 pocillos de 4,6 mm. de diámetro en cada placa.

Obtención de los leucocitos: Tomamos 20 ml. de sangre del enfermo, que desfibrinamos en tubos de plástico estériles. Se vierte en tubos de vidrio siliconizados conteniendo 2 ml de dextrano T 250 al 6%. Se deja sedimentar durante una hora, recogiendo el sobrenadante rico en leucocitos, que se centrifuga durante 5 mn a 250 g y 20°C. Los leucocitos sedimentados son lavados a continuación 3 veces en solución de Hank, centrifugando 4 mn a 200 g. y 20°C. Finalmente son resuspendidos en Medio de cultivo 199 conteniendo 10% de suero de caballo, 375 microgramos de bicarbonato sódico por ml., 66 U/ml. de penicilina y 66 microgramos/ml. de estreptomina, ajustando las células a una concentración de 2×10^8 células/ml. Con azul tripan se comprueba que al menos 90% de los leucocitos permanecen viables.

Habitualmente permanecen una cierta cantidad de hematíes, que no interfieren con la migración (CLAUSEN 1973 e).

Comprobación de la viabilidad de los leucocitos: A 1 ml. de suspensión de células se añade 0,5 ml. de solución de azul tripan al 0,5%. Se mezcla cuidadosamente durante cinco minutos y se lee inmediatamente en cámara cuenta-glóbulos. Se cuentan 100 células, observando cuántas se han teñido (células no viables).

Test de la migración leucocitaria: Los leucocitos -

obtenidos se dividen en tres muestras conteniendo cantidades iguales y se incuban durante media hora a 37°C, la primera - añadiendo Ag HB a una concentración de 156 microgramos/ml., la segunda a 52 microgramos/ml., y la tercera sin antígeno - (control). Después de la incubación, se rellenan los pocillos de las placas con las diversas muestras de leucocitos.

Habitualmente se utilizan dos placas por cada suero, llenando dos pocillos de cada una con cada muestra. Con ello cada muestra era probada por cuadruplicado. Sin embargo, cuando se obtuvo una cantidad menor de células, sólo se probaron dos o tres veces cada muestra. (No se seguía el experimento si al menos no se podía examinar por duplicado cada muestra). Las placas eran incubadas en atmósfera de aire saturada de humedad a 37°C durante 18 horas.

A continuación, medíamos el diámetro de los halos de migración. Al área de migración se calculaba restando el área del pocillo al área total del halo, La comprobación se hacía entre control y problema pertenecientes siempre a una misma placa.

El área total del control se encontraba por lo general entre 60 y 80 mm² y sólo se consideraban los resultados si este área era al menos de 45 mm² (el área del pocillo era de 16,61 mm²). Tampoco se aceptaba la prueba si entre dos áreas de la misma muestra y en la misma placa había diferencias superior al 10%.

Las concentraciones de Ag HB (52 microgramos/ml. y 156 microgramos/ml. se determinaron después de diversas prue

bas, observando que cantidades inferiores (23 microgramos/ml) producían inhibiciones menores, y que cantidades superiores (312 microgramos/ml.) producían efectos inespecíficos sobre las células.

Hemos llamado índice de migración al cociente del área de migración de los leucocitos incubados con Ag HB por el área de migración de los leucocitos incubados sin él. Se consideró positivo el test, si el índice de migración era inferior a 0,80.

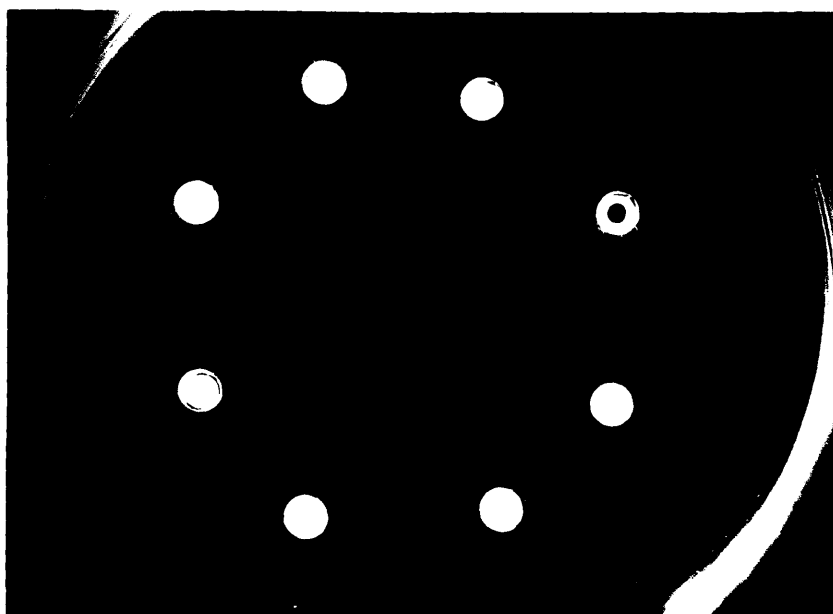


Fig. 13.- Prueba de inhibición de la migración leucocitaria.

- 1: Leucocitos incubados sin Ag HB.
- 2: Leucocitos incubados con Ag HB a una concentración de 52 microgramos/ml.
- 3: Leucocitos incubados con Ag HB a una concentración de 104 microgramos/ml.
- 4: Leucocitos incubados con Ag HB a una concentración de 156 microgramos/ml.

Se observa un menor halo de migración de los leucocitos incubados con Ag HB, especialmente de aquellos con concentraciones más elevadas, con respecto al control. Habitualmente sólo se hacían los núms. 1, 2 y 4.

IV - 2 - RESULTADOS.-

IV-2-1) DETERMINACION DE Ag y Ac HB
=====

CONTROLES SANOS.-

De los 45 casos estudiados ninguno tenia Ag HB positivo y 11 (24,4%) tenian Ac HB detectables por H.A.P. No existian diferencias significativas entre ambos sexos:

	Total	Positivos
Hembras	23	6 (26%)
Varones	22	5 (22,7%)

Clasificados por edades se observa mayor número de positividades en la 4ª y 5ª décadas de la vida y menos en las primeras (2ª y 3ª décadas), siendo la diferencia entre estos dos grupos estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

Edad	Total	Positivos	
10-19	8	1	(
20-29	8	1) 2ª y 3ª décadas: 2/16 = 12,5%
30-39	6	2	(
40-49	9	4) 4ª y 5ª décadas: 6/15 = 40%
50-59	6	1	(
60-69	6	1)
70	2	1	(

Los títulos encontrados son por lo general bajos:

1/3 : 2 casos 1/27: 4 casos
 1/9 : 4 casos ≥ 1/243: 1 caso

ENFERMOS CRONICOS NO HEPATICOS.-

De los veintiseis enfermos estudiados ninguno - tenía Ag HB por ID y nueve (34,6%) tenían Ac HB detectables por H.A.P.

Existe por tanto un mayor porcentaje de enfermos crónicos no hepáticos con Ac HB que de sujetos sanos --- (34,6% frente a 24,4%). Para descartar que esta diferencia fuera debida a la edad media ligeramente superior entre los enfermos que en los sanos (47,6% frente a 39,4%), comparamos estos enfermos con otros tantos sanos con la misma edad, observando que persiste la diferencia (ver tabla)

	Total	Positivos	Edad media
Sanos	26	7 (26,9%)	47,4
Enfermos	26	9 (34,6%)	47,6

En estos enfermos tampoco se observa una diferencia significativa entre ambos sexos (cuatro hembras y cinco varones positivos de un total de diez y dieciseis respectivamente) y los títulos son también en general bajos:

1/3 : 2 casos 1/27:3 casos
 1/9 : 2 casos ≥ 1/243:2 casos

Si reunimos ambos grupos de controles (sanos y - enfermos) y los clasificamos por sexos y edades observamos - que no existe diferencia entre sexos:

	Total	Positivos
Hembras	33	10 (30,3%)
Varones	38	10 (26,3%)

pero si existe un mayor número de personas con anticuerpos a partir de los 30 años, disminuyendo un poco a partir de los 50 años:

Edad	Total	Positivos	
10-19	9	1	(
20-29	10	1) 2ª y 3ª décadas: 2/19=10,5%
30-39	10	4	(
40-49	17	7) 4ª y 5ª décadas: 11/27=40,7%
50-59	10	2	(
60-69	13	4) 6ª década en adelante: 7/25=
70	2	1) = 28%

Estadísticamente la diferencia en los menores de 30 años y aquellos entre 30 y 49 y entre los menores de 30 años y los mayores son significativas. Sin embargo las diferencias entre los de 30 a 49 años y los mayores de 50 años no son significativas ($p > 0,05$).

ENFERMOS HEPATICOS CRONICOS.-

De los setenta y dos estudiados, diez (13,8%) tienen AgHB positivo (de ellos seis también con Ac HB) y veintinueve tienen sólo Ac HB. La frecuencia total de Ag HB y/o Ac HB es 39/72 (54%).

La diferente frecuencia de positividades con los enfermos crónicos no hepáticos es estadísticamente significa-

tiva ($p < 0,05$) lo que no puede ser atribuido a diferencias de edad ya que la media de ambos grupos es muy similar (50 y 47,6 respectivamente).

Si clasificamos estos enfermos hepáticos según su diagnóstico observamos que la frecuencia de Ag y/o Ac HB es mayor en los cirróticos que en las H.C.A. y mayor en éstas que en las H.C.P. Sin embargo estas diferencias no llegan a ser estadísticamente significativas ($p > 0,05$) :

Diagnóstico	nº casos	Ag HB	Ac HB	Ag+Ac HE	Total
H.C.P.	15	0	5	1	6 (40%)
H.C.A.	31	4	9	4	17 (54,6%)
Cirrosis	26	0	15	1	16 (61,5%)
<u>T o t a l</u>	72	4	29	6	39 (54%)

De los setenta y dos enfermos estudiados treinta y ocho (52,7%) eran bebedores habituales y en ellos se observa una frecuencia de Ag y/o Ac HB menor que en los no bebedores, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$)

	nºCasos	Ag HB	AC HB	Ag+Ac HB	Total
Bebedores	38	0	16	1	17(44,7%)
No bebedores	34	4	13	5	22(64,7%)

Si tomamos solo los enfermos con Ag HB negativo , esta diferencia se hace mucho menor (la frecuencia de Ac HB positivos es en ellos de 43,2% y 52% respectivamente) y ya no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$)

Si comparamos los treinta y cuatro enfermos hepáticos no bebedores con los veintiseis enfermos crónicos no hepáticos observamos que existe una diferente frecuencia de Ag y/o Ac HB (64,7% y 34,6%) que es estadísticamente significativa ($p < 0,025$).

Por el contrario la diferencia entre los treinta y ocho enfermos hepáticos bebedores y los enfermos crónicos no hepáticos (frecuencia de Ag y/o Ac HB de 44,7% y 34,6%) respectivamente) no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$).

Los títulos de Ac HB de los Ag HB negativos son por lo general bajos no existiendo diferencias marcadas dependiendo del diagnóstico:

Diagnóstico	Título de Ac HB					
	0	1/3	1/9	1/27	1/81	$\geq 1/243$
H.C.P.	9	3	-	1	1	-
H.C.A.	14	3	1	2	1	2
Cirrosis	10	4	3	5	1	2
Total.....	33	10	4	8	3	4

ENFERMOS EN PROGRAMA DE HEMODIALISIS.-

De los treinta y cinco enfermos estudiados, tres fueron en su primera determinación Ag HB positivos. De los otros treinta y dos enfermos, dieciseis (50%) presentaron ya en la primera determinación Ac HB demostrables por

H.A.P. Esta determinación fué realizada en la mayoría de los casos en Junio de 1973 y en el resto poco después de que comenzaran a dializarse en la unidad (tabla IV).

Los varones presentaron una incidencia superior a las hembras, pero la diferencia entre ambos no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$)

	Total	Ac HB positivos
Varones	20	11 (55%)
Hembras	12	5 (41,6%)

Tampoco existen diferencias marcadas según la edad de los enfermos (tabla IV).

Si comparamos estos enfermos con los controles sanos vemos que tienen Ac HB con una frecuencia muy superior a éstos (50% frente al 24,4%) siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,025$).

Los títulos de Ac HB encontrados en estos enfermos fueron:

1/3 : 2 Casos	1/27 : 3 Casos	≥ 1/243:3 Casos
1/9 : 6 Casos	1/81: 2 casos	

Veintinueve de estos enfermos fueron estudiados periódicamente durante periodos de tiempo comprendidos entre los 2 y los 13 meses, entre Junio de 1973 y Julio de 1974. En ellos se determinaron entre otros datos la TGO, el Ag HB y los Ac HB.

La aparición de una epidemia de hepatitis B durante este tiempo en la unidad de diálisis nos permitió hacer

una serie de observaciones interesantes sobre la evolución de estos enfermos. En total en la unidad, once enfermos -- presentaron Ag HB positivo, con alteraciones más o menos -- marcadas tanto clínicas como bioquímicas. El primero de -- ellos fué el caso R-22, enferma a la que no se habían deter -- minado previamente los Ac HB, que en Agosto 1973 presentó -- una elevación de las transaminasas y Ag HB positivo. Después en Octubre apareció un segundo caso y sucesivamente tres -- en Noviembre, uno en Enero, uno en Febrero, uno en Abril, -- uno en Mayo, y uno en Junio y uno en Julio.

De estos once enfermos, ocho tenían determinacio-- nes previas de Ac HB. En seis casos éstos habían sido nega-- tivos, otro (caso R-34) había tenido un título de 1/9, que posteriormente se había negativizado, y el octavo (caso R-18) había tenido dos determinaciones previas positivas, la primera con un título de 1/9 y la segunda con un título de 1/3. Entre esta última determinación y la aparición del Ag HB transcurrió mes y medio. La diferente frecuencia de he-- patitis B entre los enfermos con y sin Ac HB es estadísti-- camente significativa, incluso considerando como positivo el caso R-34. ($p < 0,05$).

Enfermos revisados periódicamente	Hepatitis
Ac HB positivos.... 13	2 (15,3%)
Ac HB negativos.... 13	6 (46,1%)

Si incluyéramos al caso R-34 entre los negativos, teniendo en cuenta que se había negativizado antes de pade

cer la hepatitis, la diferencia se haría entonces muy significativa ($p < 0,025$)

Otro de los motivos que nos hicieron seguir periódicamente a estos enfermos era observar si la presencia de Ac HB y su título estaba o no sometido a oscilaciones.

Los trece casos con la primera determinación negativa, que seguimos periódicamente presentarán:

- Tres (casos R-6, R-15, R-16) una hepatitis B, después de la primera determinación, haciéndose el Ag HB positivo.

- Tres (casos R-24, R-27, R-33) AcHB persistentemente negativos (realizándose 3, 6 y 4 determinaciones respectivamente) hasta que presentaron la hepatitis B.

- Cuatro (casos R-12, R-14, R-29, R-30) Ac HB persistentemente negativos durante todo el estudio (realizándose 8, 7, 2 y 6 determinaciones respectivamente).

- Dos (Casos R-11, R-13) dos determinaciones consecutivas negativas, haciéndose ambos positivos simultáneamente en Noviembre de 1973 teniendo también un discreto aumento de las transaminasas (esto coincidió con la época en que otros cuatro enfermos presentaron una hepatitis B).

Desde entonces todas sus determinaciones (cuatro para el caso R-11 y cinco para el caso R-13, fueron positivas.

- Uno (caso R-20) ha sufrido diversas oscilaciones, teniendo cinco determinaciones negativas y tres positivas.

En resumen, excluyendo los tres enfermos que se hicieron Ag HB positivo después de la primera determinación,

y no han vuelto a negativizarse (casos R-6, R-15, R-16), - el resto menos uno (9 casos) han tenido un comportamiento de las determinaciones de Ac HB muy estable.

Los trece casos con la primera determinación de Ac HB positiva se comportaron de la siguiente forma:

- Los dos casos que presentaron una hepatitis B, tuvieron dos determinaciones previas, negativizándose la segunda en uno de ellos (caso R-34).

- Seis (casos R-1, R-5, R-28, R-31, R-19, R-32,) tuvieron Ac HB persistentemente positivos (repetidos 6,6,6,4,5 y 7 veces respectivamente) sin grandes oscilaciones en los títulos.

- Dos (casos R-9 y R-2) tuvieron todas las determinaciones positivas (5 cada uno) sufriendo un brusco aumento del título en Noviembre 1973 y Enero 1974 respectivamente que se mantuvo en el resto de las determinaciones.

- Dos (casos R-17, R-35) se han negativizado en la última determinación (6ª y 2ª respectivamente) observándose en el primero de ellos cómo el título iba progresivamente disminuyendo hasta llegar a desaparecer.

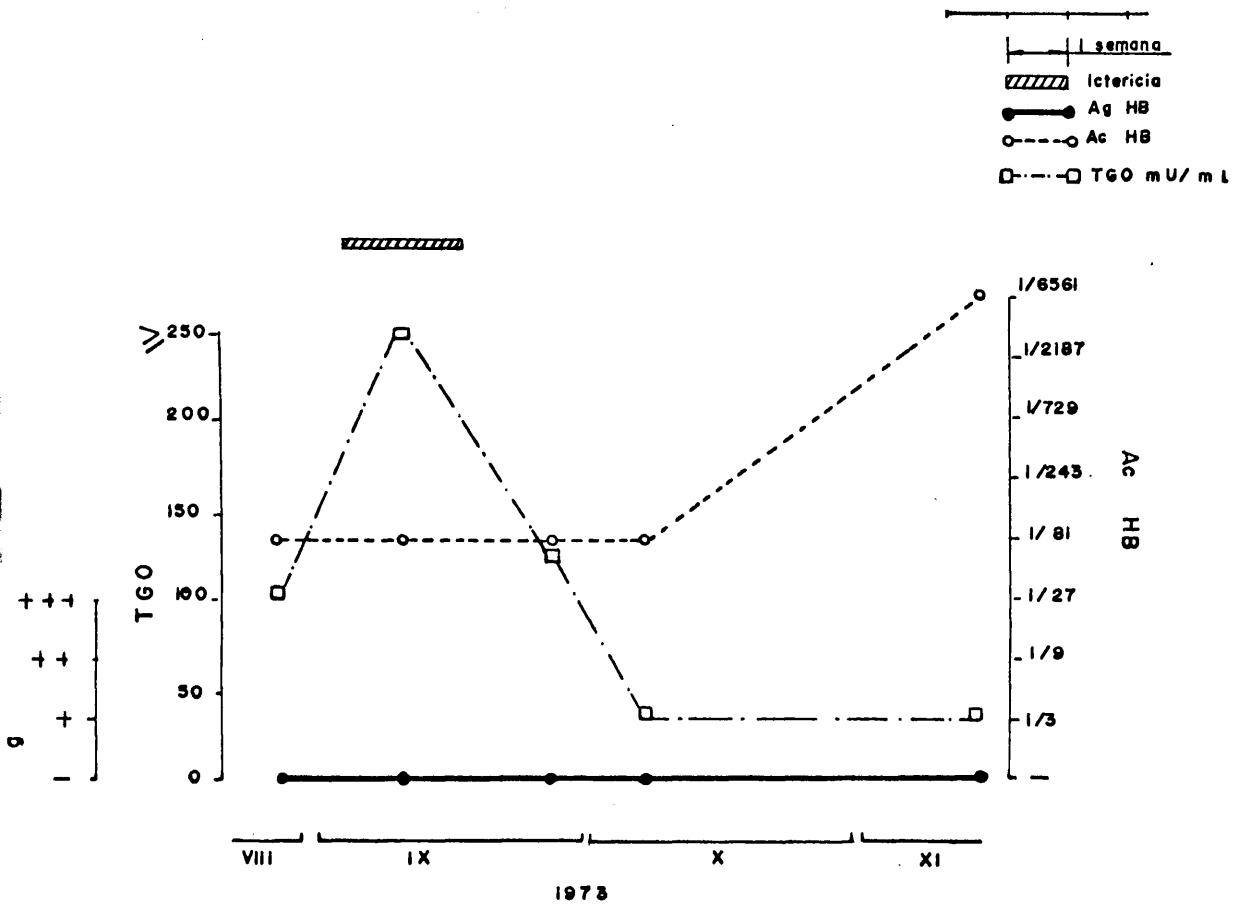
- Uno (caso R-10) ha sufrido diversas oscilaciones teniendo cuatro determinaciones positivas y otras tantas negativas.

En resumen, los título de Ac HB son bastante constantes a lo largo de los meses, pero pueden llegar a desaparecer (tres casos, uno de los cuales sufrió posteriormente una hepatitis B) o aumentar bruscamente, muy proba--

blemente como consecuencia de una nueva exposición al Ag - HB, que en los dos casos que hemos observado no se ha acompañado de elevación de las transaminasas ni ningún otro -- signo ni síntoma de hepatitis.

De los dieciocho enfermos estudiados periódicamente en los que no se objetivó nunca el Ag HB positivo, ocho tuvieron en algún momento de su estudio la TGO superior a 100 U. Estas elevaciones de la TGO son en general muy difíciles de explicar, pues con frecuencia no se acompañan de síntomas u otros datos analíticos patológicos. Entre otras causas pueden ser debidos además de a una hepatitis B, a -- daño hepático producido por virus de la hepatitis A, herpes virus, citomegalovirus u otros virus (Prince y cols. - 1974, Laitinen y Vaben 1974), por toxicidad de las drogas administradas a estos pacientes (anabolizantes, etc), o -- simplemente a éstasis hepático por insuficiencia cardiaca.

De estos ocho casos, dos (R-11 y R-13) presentaron por primera vez Ac HB en la época en que se elevaron las -- transaminasas, por lo que se puede afirmar que padecieron una hepatitis B subclínica. Un tercero, (caso R-9) el único que llegó a tener ictericia y un episodio claro de hepatitis, - tenía previamente un título de Ac HB de 1/81 que no se modifico durante este cuadro (que ocurrió en Septiembre de 1973). Sin embargo, dos meses más tarde, en Noviembre, cuando ya - su cuadro de hepatitis había desaparecido totalmente tuvo un aumento brusco del título de Ac HB (ver gráfica caso R-9).



Caso R-9 : RFA. ♀ 35 años

Caso	Enfermo	Edad	Sexo	Comienzo hemodíalisis	1ª determinación		E v o l u c i ó n	
					Fecha	AghB AchB		
R-1	D.A.V.	41	H.	IV-1973	VI-1973	-	1/27	Hasta VIII-1974 AgHB \emptyset AchB †.
R-2	D.A.A.	34	V.	II-1972	VI-1973	-	1/81	Hasta VIII-1974 AgHB \emptyset AchB 1/729 desde I-1974.
R-3	J.A.R.	29	V	VII-1971	VI-1973	-	1/9	Transplante X-1973.Fallece XII-1973.
R-4	R.B.M.	30	V.	X-1971	VI-1973	-	1/9	Transplante X-1973.Fallece XII-1973.
R-5	M.C.S.	24	H.	I-1974	VI-1973	-	1/3	Hasta VIII-1974 AgHB \emptyset y AchB †.
R-6	A.D.G.	23	H.	VI-1973	VI-1973	-	-	<u>Hepatitis B</u> , XI-1973.(Gráf.hepatitis caso 44).
R-7	M.F.V.	32	V.	IV-1973	VI-1973	-	1/243	Transplante VII-1973.Hasta VIII-1974 AgHB \emptyset .
R-8	R.F.T.	32	V.	IV-1973	VI-1973	-	-	Traslado a otro Hospital el 18-VI-1973
R-9	R.F.A.	35	H.	V-1973	VI-1973	-	1/81	AchB 1/2187 desde XI-1973. (Gráfica caso R-9). Fallece IV-1974.
R-10	G.G.G.	20	V.	XI-1972	VI-1973	-	1/27	Hasta VIII-1974 AgHB \emptyset , AchB \emptyset en tres ocasiones.
R-11	F.H.G.	33	V.	XII-1972	VI-1973	-	-	Hasta VIII-1974 AgHB \emptyset . AchB † desde XI-1973.Entonces aumento TGO.
R-12	M.H.L.	53	V.	VI-1972	VI-1973	-	-	Blqueo A-V completo.Fallece VIII-1974 Ag y AchB \emptyset .
R-13	C.M.P.	19	H.	X-1972	VI-1973	-	-	AgHB \emptyset . AchB † desde XI-1973.

..../....

Caso	Enfermo	Edad	Sexo	Comienzo hemodíalisis	1ª determinación		E v o l u c i ó n
					Fecha	AgHB AchB	
R-14	J.L.C.	46	H.	I-1972	VI-1973	-	Hasta VIII-1974:AgHB Ø. AchB Ø
R-15	R.M.L.	35	H.	IV-1973	VI-1973	-	<u>Hepatitis B</u> en XI-1973 (Hepatitis caso 32)
R-16	P.N.I.	34	V.	VIII-1971	VI-1973	-	<u>Hepatitis B</u> en XI-1973 (Hepatitis caso 35).
R-17	M.Q.P.	23	V.	I-1973	VI-1973	- 1/3	Hasta VIII-1974 AgHB Ø. Desde VI-1974 AchB Ø.
R-18	M.R.C.	29	V.	III-1973	VI-1973	- 1/9	<u>Hepatitis B</u> en 1974 (Enero) (Hepatitis caso 36).
R-19	M.R.F.	37	V.	VI-1970	VI-1973	- 1/9	Hasta VIII-1974 AgHB Ø. AchB †
R-20	J.S.M.	22	V.	III-1973	VI-1973	-	Hasta VIII-1974 AgHB Ø. AchB † en 3 ocasiones.
R-21	L.T.G.	38	V.	VI-1970	VI-1973	-	Transplante IX-1973.
R-22	A.S.F.	26	H.	XII-1969	VIII-1973 †	-	<u>Hepatitis B</u> en VIII-1973 (Hepatitis caso 31).
R-23	F.V.V.	26	H.	III-1973	VI-1973	-	Transplante IX-1973. Hasta entonces AgHB Ø.
R-24	E.R.P.	57	V.	VIII-1973	IX-1973	-	<u>Hepatitis B</u> en II-1974. (Hepatitis caso 37).
R-25	E.P.R.	33	H.	IV-1974	XI-1973 †	-	<u>Hepatitis B</u> en XI-1973 (Hepatitis caso 33).

.../...

Caso	Enfermo	Edad	Sexo	Comienzo hemodiálisis	1ª determinación		Evolución
					Fecha	AgHB ACHB	
R-26	S.A.P.	33	V.	XI-1973	XI-1973	† -	<u>Hepatitis B</u> en XI-1973. (Hepatitis caso 34).
R-27	M.C.T.	32	H.	X-1973	XI-1973	-	<u>Hepatitis B</u> en VII-1974. (Hepatitis caso 41).
R-28	A.L.A.	17	V.	VIII-1973	XI-1973	- 1/27	Hasta VIII-1974 AgHB Ø, ACHB †
R-29	M.M.L.	52	V.	XI-1973	XI-1973	-	Diálisis en casa desde II-1974. Hasta entonces Ag y ACHB Ø
R-30	M.M.F.	28	H.	VI-1973	XI-1973	-	Hasta VIII-1974 Ag y ACHB Ø
R-31	C.Q.Q.	37	H.	VI-1973	XI-1973	- 1/2187	Hasta VIII-1974 siempre AgHB Ø y ACHB Ø
R-32	A.S.B.	43	V.	VIII-1973	XI-1973	- 1/243	Hasta VIII-1974 AgHB Ø y ACHB †.
R-33	U.A.G.	52	V.	XII-1973	I-1974	-	<u>Hepatitis B</u> en II-1974. (Hepatitis caso 39).
R-34	J.D.M.	25	V.	XII-1973	II-1974	- 1/9	III-1974 AgHB Ø. <u>Hepatitis B</u> en VI-1974 (Hepatitis caso 40)
R-35	A.C.L.	35	H.	II-1974	III-1974	- 1/9	Hasta VIII-1974 AgHB Ø. ACHB Ø en V-1974

Tabla 4.- Enfermos en programa de hemodiálisis

Esto coincidió con la aparición de Ag HB en un miembro -- del personal y cuatro enfermos, con la aparición de Ac HB por primera vez en otros dos y con una elevación brusca - de los Ac HB, similar a la de esta enferma en otro más. - Si su hepatitis hubiera sido del tipo B, la respuesta de Ac HB hubiera aparecido al principio del proceso, como veremos ocurrió en otros casos.

Hay que aceptar entonces que la hepatitis haya - tenido otra etiología.

El aumento de las transaminasas de los otros cinco enfermos (casos R-1, R-10, R-20, R-25 y R-29) en general discretos, también debieron estar provocados por factores independientes del virus de la hepatitis B.

DONANTES DE SANGRE RETRIBUIDOS.-

De los noventa y dos donantes Ag HB negativos estudiados, cuarenta y siete (51%) han presentado Ac HB por H.A.P. La diferencia entre la frecuencia de aparición de Ac HB en controles sanos y estos donantes es estadísticamente muy significativa ($p < 0,0025$).

Los títulos encontrados son los siguientes:

1/3 : 11 casos	1/27 : 15 casos	⇒ 1/243:7 casos
1/9 : 7 casos	1/81 : 7 casos	

De los veintiún donantes portadores de Ag HB estudiados, sólo cinco (23,8%) han presentado Ac HB detecta-

bles. Si comparamos la frecuencia de Ac HB entre los enfermos con hepatopatías crónicas y Ag HB positivos y estos portadores de Ag HB, la diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,025$).

	nº casos	Ac HB positivo
Enfermos Ag HB positivo	10	6 (60%)
Donantes Ag HB positivo	21	5 (23,8%)

A todos estos portadores del Ag HB se les ha determinado la TGO a la vez que los Ac HB. Aquellos con Ac HB positivos tenían niveles de TGO entre 140 y 67 mU (media 111,6) y los Ac HB negativos, niveles entre 100 y 24 mU (media 51,6), estando todas las determinaciones menos seis dentro de límites normales (ver gráfica). La diferencia entre los niveles de TGO de ambos grupos es estadísticamente muy significativa: ($p < 0,0005$).

PERSONAL TRABAJANDO EN ZONAS DE ALTO RIESGO Y OTROS LABORATORIOS.-

Se han hecho un total de cincuenta determinaciones de Ag y Ac HB a treinta personas estudiadas, que trabajan en las zonas consideradas de alto riesgo.

Ag HB: En estas determinaciones realizadas como control de sujetos que no presentaban sintomatología alguna, el Ag HB ha sido negativo por ID en todos los casos.

Ac HB: Considerando la primera determinación realizada a cada sujeto los resultados han sido:

	Positivos	Negativos	Total
Dpto. de Inmunología	7	3	10
Unidad de diálisis	8	4	12
Lab. de Nefrología	1	2	3
Dpto. de Hematología	4	1	5
	20(66,6%)	10	30

Comparando la frecuencia de Ac HB en estos sujetos, con la frecuencia en controles sanos, o en enfermos crónicos no hepáticos, las diferencias son estadísticamente muy significativas ($p < 0,00025$ y $p < 0,025$ respectivamente.).

Los títulos de Ac HB en estos sujetos han sido:

	Neg.	1/3	1/9	1/27	1/81	$\geq 1/243$	Total
Inmunolog.	3	2	2			3	10
Hemodiál.	4	1		1	2	4	12
Lab.Nefrolog.	2		1				3
Hematología	1	1	1			2	5
Totales...	10	4	4	1	2	9	30

Observamos que existen numerosos sujetos con títulos elevados ($\geq 1/81$). Si comparamos la frecuencia de títulos elevados entre las personas correspondientes a los diversos grupos estudiados tenemos:

	$\leq 1/27$	$\geq 1/81$	Total
Controles sanos	9	2(18,1%)	11
Enfermos crónicos no hepáticos	7	2(22,4%)	9
Enfermos crónicos hepáticos...	22	7(24,1%)	29
Enfermos en diálisis	11	5(31,2%)	16
Donantes retribuidos.....	33	14(29,7%)	47
Personal en zonas de alto riesgo	9	11(55%)	20

Siendo las diferencias estadísticamente significativas entre las personas trabajando en zonas de alto riesgo y los controles sanos ($p < 0,05$), los enfermos hepáticos crónicos ($p < 0,025$) y los donantes de sangre ($p < 0,05$)

De las treinta personas trabajando en zonas de alto riesgo estudiadas, una ha tenido una hepatitis B con posterioridad a la determinación de Ag y Ac HB. Pertenece a la unidad de hemodiálisis y tenía un título previo (tres meses antes de comenzar el cuadro) de Ac HB de 1/3. Como consecuencia de esta infección su título subió a -- 1/81. (Ver hepatitis caso 15).

En otras nueve de estas personas se han realizado más de una determinación (entre dos y seis determinaciones según los casos). De ellos siete eran positivos en la primera determinación y lo siguieron siendo a títulos similares a los que habían tenido previamente.

Los otros dos, negativos en la primera determinación (uno de la unidad de hemodiálisis y uno del Departamento de

Inmunología) se hicieron positivos seis y diez meses más tarde (títulos 1/9 y 1/3). Repetida la determinación un mes después en uno de ellos, volvió a ser positiva al mismo título (1/3). En ninguno de estos dos casos aparecieron signos clínicos de hepatitis, ni tampoco fué positivo el Ag HB en esa determinación ni en las anteriores (realizadas seis y dos meses antes).

Si consideramos el número de personas con Ac HB al final del estudio tenemos veintidos de treinta (73,3%), siendo las diferencias con todos los demás grupos estadísticamente significativa:

Frente a controles sanos:	$p < 0,00005$
Frente a enfermos crónicos no hepáticos:	$p < 0,0025$
Frente a enfermos con hepatopatías crónicas:	$p < 0,05$
Frente a enfermos en diálisis:	$p < 0,05$
Frente a donantes:	$\bar{p} < 0,025$

LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA.-

También fueron estudiados los diecinueve miembros del laboratorio de microbiología. Presentamos los resultados separadamente, dado que en este laboratorio es mucho menos frecuente la presencia de sangre de enfermos Ag HB positivo.

Los diecinueve casos fueron negativos para Ag HB y seis (31,5%) tuvieron Ac HB detectables por H.A.P.

Cuando se comparan los resultados con los de las personas trabajando en zonas de alto riesgo, la diferencia es estadísticamente muy significativa ($p < 0,005$).

Los títulos de Ac HB encontrados fueron:

1/9 : 2 casos 1/81 : 1 caso
1/27: 1 caso \geq 1/243: 2 casos.

Cuatro meses más tarde de realizarse estas determinaciones una de estas personas padeció una hepatitis B (ver hepatitis caso 26). Se trataba de una persona encargada de la limpieza del material que desde hacía 6 meses limpiaba también material procedente del laboratorio de inmunología. La determinación previa de Ac HB había sido negativa.

FAMILIARES DE ENFERMOS CON Ag HB CRONICAMENTE POSITIVO.-

Ag HB: De los treinta y dos familiares estudiados, sólo tres (9,3%) tenían Ag HB en suero detectable por ID. Los tres eran hijos varones de padres con Ag HB persistentemente positivo. En uno de los caso (familia 4) determinaciones posteriores demostraron también la persistencia del Ag HB en el hijo.

Ac HB: De los veintinueve familiares Ag HB negativo, veintitres (79,3%) presentaban Ac HB. Los títulos de estas determinaciones fueron:

1/3 : 3 Casos 1/27 : 5 casos
1/9 : 6 casos 1/81 : 3 casos \geq 1/243: 6 casos

Ag o Ac HB: De los treinta y dos familiares estudiados, veintiseis (81,25%) muestran haber tenido contacto con el virus de la hepatitis B (presencia de Ag o Ac HB en sangre).

Si comparamos esta frecuencia con la de los demás grupos observamos que las diferencias son estadísticamente significativas:

Frente a controles sanos: $p < 0,00005$

Frente a enfermos crónicos no hepáticos: $p < 0,00025$

Frente a enfermos crónicos hepáticos: $p < 0,005$

Frente a enfermos en diálisis: $p < 0,005$

Frente a donantes de sangre: $p < 0,0025$

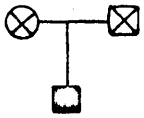
Frente a personal de Lab.de Microbiología: $p < 0,00025$

No siendo sin embargo significativa la diferencia con las personas trabajando en zonas de alto riesgo de contagio por virus de la hepatitis B ($p > 0,05$).

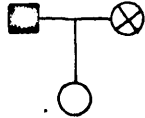
Si comparamos ambos sexos no existen diferencias -- significativas

	nº casos	Ag HB	Ac HB	Total
Hembras	18	0	14	14 (77,7%)
Varones	14	3	9	12 (85,7%)

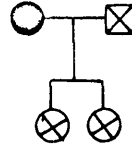
Si los subdividimos según su parentesco con el enfermo portador del Ag HB observamos que todos los familiares de su misma generación (esposos de los adultos y hermanos o primos de los niños) tienen Ac HB mientras que solo algunos de las otras generaciones (padres, tíos e hijos) -



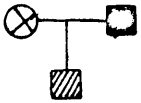
Familia 1 (J.M.G.E.)



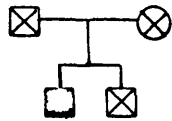
Familia 2 (M.R.S.)



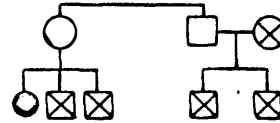
Familia 3 (E.M.T.)



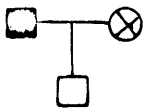
Familia 4 (J.M.G.)



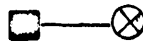
Familia 5 (J.V.H.)



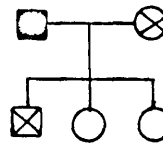
Familia 6 (T.R.G.)



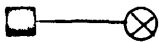
Familia 7 (C.A.G.)



Familia 8 (A.R.R.)



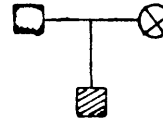
Familia 9 (A.C.P.)



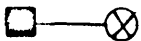
Familia 10 (M.M.R.)



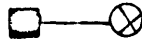
Familia 11 (H.G.S.)







Familia 12 (C.A.A.)



Familia 13 (M.E.M.)



Familia 14 (J.C.C.)

-  Enfermo portador crónico
-  Familiar Ag HB positivo
-  " Ac HB positivo
-  " negativo para Ag y Ac HB

Gráfica IV-2: Estudio de familiares de enfermas hepaticas con Ag HB cronicamente positivo

tienen Ag ó Ac HB.

	Nº casos	Ag HB	Ac HB	Con Ag o Ac HB
Padres	5	0	4	4) generación superior (5/7=71,4%
Tíos	2	0	1	1) superior
Esposos	10	0	10	10) misma
Hermanos	3	0	3	3) (15/15=100%
Primos	2	0	2	2) generación inferior
Hijos	10	3	3	6) generación inferior 6/10=60%

Si comparamos estadísticamente la frecuencia de Ag HB o Ac HB entre los familiares de la misma generación y los de la superior e inferior, ambas diferencias son significativas ($p < 0,025$ y $p < 0,005$ respectivamente).

Si comparamos la frecuencia de Ag o Ac HB en los esposos con la de los familiares consanguíneos reunidos, la diferencia es también estadísticamente significativa ($p < 0,05$) pero mucho menor que si comparamos los de la misma generación con los de las demás generaciones reunidos ($p < 0,01$).

Si consideramos los títulos elevados de Ac HB, observamos que de los nueve superiores o iguales a 1/81, ocho corresponden a familiares de la misma generación (cuatro esposas, dos hermanos y dos primos) y uno a un hijo de un enfermo. Esta diferencia entre títulos de Ac HB de los familiares de la misma y distinta generación también es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

	Ac HB Positivos	Ac HB ≥ 1/81
Misma generación	15	8 (53,3%)
Otras generaciones	8	1 (12,5%)

ENFERMOS CON HEPATITIS AGUDAS TIPO B.-

Por sus manifestaciones clínicas y su evolución estos enfermos pueden clasificarse en dos grupos:

A) Enfermos sin patología previa o con enfermedades que no modifican el curso de la hepatitis aguda.

B) Enfermos en insuficiencia renal terminal, incluidos en el programa de hemodiálisis periódicas y enfermos transplantados y tratados con terapéutica inmunosupresora.

A) Hemos estudiado treinta enfermos del primer grupo. Casos 1 a 30. De estos enfermos todos menos uno (caso 24), han tenido algunos síntomas típicos de la enfermedad: Astenia, anorexia, urticaria, artralgias, mialgias, febrícula, molestias en hipocondrio derecho, hipocolia, coluria, e ictericia (esta última en veintiseis casos).

En veintidos casos no existía ningún antecedente claro que indicara el momento del contagio, sin embargo ocho de ellos estaban sometidos a un alto riesgo de infección -- por el medio en el que vivían:

- Tres ATS (Casos 5, 7 y 22) una de ellas trabajando en quirófanos, otra en la unidad de hemodiálisis, y la tercera en una sala de medicina interna.

- Una (caso 15) prestando sus servicios en la unidad de hemodiálisis.

- Uno (caso 17) novio de una enferma que acababa de padecer una hepatitis aguda tipo B.

- Una (Caso 23) esposa de un enfermo Ag HB positivo.

- Uno (Caso 9) cirujano del departamento de Urología.

- Una (caso 26) empleada encargada de la limpieza de material del Departamento de Inmunología.

Otros siete tenían un antecedente, origen muy probable de la infección:

- Uno había sido transfundido cuatro meses antes (caso 3)

- Cinco habían sido intervenidos quirúrgicamente, (el caso 10) de un mesotelioma epiploico cuatro meses antes, (el caso 12) había recibido una doble prótesis cardiaca cuatro meses antes, al caso 25 le había sido extirpado un quiste hidatídico, y al caso 28 se le había practicado una anuloplastia mitral seis meses antes y al caso 19 se le había colocado una prótesis mitral tres meses antes.

- Una enfermedad había dado a luz dos meses antes (caso 30).

Finalmente en un caso (caso 14) existía un antecedente indudable de contagio. Se trataba de un cirujano cardiovascular que había recibido un pinchazo con una aguja operando a un enfermo Ag HB positivo.

Dos casos tenían en su historia un episodio previo de hepatitis aguda. Ambas eran ATS (casos 7 y 22). A la primera de ellas se le había practicado una determinación de Ag

HB durante dicho episodio siendo negativo y a la otra se le había practicado una vez curado el cuadro, siendo también negativo.

Hay que pensar que muy probablemente estos episodios previos correspondieron a hepatitis A.

De los treinta casos estudiados, el Ag HB se negativizó en veintiocho. La duración máxima de la antigenemia desde el comienzo de los síntomas fué de 10 semanas (casos 9 y 14). Uno de ellos sin embargo (caso 22) al volver a revisión tres meses más tarde tenía el Ag HB positivo de nuevo. De los dos casos en los que no se llegó a observar la negativización del Ag HB, uno (caso 29) no se repitió la determinación al volver a revisión cuando el resto de los datos clínicos y analíticos eran normales, y el otro (caso 17) persistió con TGO y TGP elevadas, y el Ag HB positivo durante los seis meses en que se siguió su evolución (realizándose un total de seis determinaciones); tanto este paciente como el caso 22, habían tenido un episodio agudo con poca sintomatología no llegando a tener ictericia.

Los Ac HB fueron negativos en la primera determinación en veintitres casos. De ellos, en catorce se hicieron posteriormente positivos. Sólo uno de estos casos (nº21), presentó Ac HB cuando todavía el Ag HB era detectable por ID (sexta semana después del comienzo de los síntomas) negativizándose a la semana siguiente. En el resto, (13 casos) los Ac HB aparecieron cuando el Ag HB ya se había negativizado.

zado (en general entre 1 y 5 semanas después de negativizarse el Ag HB y entre 4 y 10 semanas después del comienzo de los síntomas). Los títulos en general fueron bajos llegando sólo en cuatro casos a 1/81 (casos núms. 2,3,5,10).- En los nueve casos en que no encontramos ninguna determinación de Ac HB positivos, los enfermos fueron seguidos menos de cinco semanas en tres casos (casos núms. 19,24 y 29), - entre cinco y diez semanas en otros cuatro casos (casos -- núms. 8,10,26 y 27) y doce semanas en un caso (nº14) que - permaneció con Ag HB positivo durante diez semanas. En el otro caso (nº 1) sólo se determinaron los Ac HB, 21 y 22 - meses después de ocurrido el episodio de hepatitis B y ambas determinaciones fueron negativas.

En resumen, de estos veintitres enfermos se hicieron setenta y seis determinaciones de Ac HB por hemaglutinación siendo:

- Negativas las doce determinaciones practicadas en las tres primeras semanas después del comienzo de los síntomas.

- Positivas tres de las veintidós (13,6%) determinaciones practicadas entre las cuatro y las seis semanas.

- Positivas seis de las diecinueve (31,5%) determinaciones practicadas entre las siete y las nueve semanas.

- Positivas cuatro de las doce (33,3%) determinaciones practicadas entre las diez y las trece semanas.

- Positivas cuatro de las seis (66,6%) practicadas,

entre las trece y las dieciocho semanas. Las dos negativas correspondían a enfermos (casos núms. 4 y 10) que las habían tenido previamente positivas

- Tres determinaciones practicadas a los cinco, ocho y diez meses fueron positivas.

- Dos determinaciones practicadas al caso nº1 a los veintiun y veintidos meses fueron negativas.

Observamos que el mayor número de determinaciones positivas ocurren a partir de las siete semanas, persistiendo algunas después de varios meses de pasada la hepatitis y negativizándose en cambio otros (casos 4 y 10) después de tres meses del comienzo de los síntomas.

En siete casos (17,5%) los Ac HB fueron positivos en la primera determinación practicada, cuando el Ag HB aún era positivo y cuando habían transcurrido entre dos y cinco semanas después del comienzo del cuadro (casos 15, 17, 22, 23, 25, 28 y 30). En todos estos casos los Ac HB fueron positivos en todas las determinaciones. El caso 15 era una empleada de la unidad de Hemodiálisis que cuatro meses antes de comenzar su enfermedad tenía una determinación de Ac HB positiva a un título de 1/3. Dos semanas después del comienzo de la hepatitis, el título era de 1/81 y todas las determinaciones fueron positivas (un total de siete, la última a los siete meses). En este caso está claro que la aparición tan precoz de los Ac HB se debe a que se trata de una respuesta secundaria. En los demás casos no tenemos determi

naciones previas, pero pensamos que probablemente se trate también de enfermos que habían tenido un contacto previo con el Ag HB, no quedando totalmente inmunizados (al menos aquellos en los que los Ac HB han sido encontrados más precozmente en el transcurso de la enfermedad).

B) Enfermos en programa de hemodiálisis periódicas y enfermos transplantados y tratados con inmunosupresores.

Hemos estudiado catorce enfermos pertenecientes a estos, once en hemodiálisis periódicas al aparecer el Ag HB positivo (casos 31 a 41) y tres transplantados (casos 42 a 44).

De los once enfermos en programa de hemodiálisis ocho llevaban al menos cinco meses dializándose en la unidad, cuando apareció el Ag HB positivo. Otros dos (casos 38 y 40) se dializaban en su domicilio, pero se habían dializado en la unidad cinco y dos meses antes respectivamente. El otro caso (nº 34) acababa de ingresar en el programa unos días antes y se le estaban practicando aún diálisis peritoneales.

De los tres transplantados, el caso 43 había estado en hemodiálisis hasta un mes antes de aparecer la hepatitis, el caso 44 hasta cinco meses antes y el caso 42 hasta dieciocho meses antes, siendo éste el único caso en el que se pueden descartar las hemodiálisis como fuente de la infección.

En once de los catorce casos la hepatitis cursó de

forma anictérica y prácticamente sin sintomatología, siendo diagnósticas al encontrar en análisis de control, transaminasas elevadas y Ag HB positivo.

En los otros tres casos el curso fué también más benigno que en los enfermos de grupo A), desapareciendo la sintomatología al cabo de dos a cuatro semanas y no sobrepasando las cifras de bilirrubina total los 2,2 mg., 6,1 mg. y 5,7 mg%. (casos 33,34 y 40 respectivamente).

De los catorce enfermos estudiados solo a uno se le ha negativizado el Ag HB (caso 34). Este enfermo es el que tuvo el cuadro agudo más florido, con la cifra de bilirrubina más elevada, Es también el que llevaba menos tiempo en una situación de insuficiencia renal terminal (acababa de empezar a dializarse pocos días antes).

En los doce enfermos en los que se han determinado periódicamente los Ac HB después de presentarse el Ag HB en sangre, se ha observado la aparición de dichos anticuerpos. En el caso 34 cuyo Ag HB se hizo negativo, después de negativizarse éste y en los demás coexistiendo con el Ag HB. En estos casos es muy difícil precisar el tiempo que ha transcurrido entre el comienzo de la enfermedad y la aparición del Ac HB pues la mayoría de los casos son prácticamente asintomáticos.

En resumen, la aparición de Ag HB en sangre de los enfermos en programa de hemodiálisis periódicas y transplantados, produce un cuadro muy diferente, tanto en su presen

tación como en su evolución al que se produce en enfermos -
previamente sanos o con otros procesos (ver tabla 5).

B) Dializados y transplantados	A) Otros enfermos.
- Asintomática (11/14 casos)	- Sintomática (29/30 casos).
- Anictérica (11/14 casos)	- Ictericia (26/30 casos).
- TGO persiste con frecuencia elevada después de varios meses (8/14 casos).	- TGO se normaliza al cabo de algunas semanas (25/26 casos).
- Ag HB persistentemente positivo (13/14 casos).	- Ag HB negativo al cabo de algunas semanas (27/29 casos)
- Ac HB detectados mientras persiste el Ag HB (11/12 casos).	- Ac HB aparecen en general después de desaparecer el Ag HB (14/21 casos).

Tabla 5.-Evolución de las hepatitis agudas tipo B.

En ninguno de los dos grupos de casos la aparición de Ac HB detectables por H.A.P. coincide con una mejora o empeoramiento de la evolución del proceso.

RESUMEN DE LAS OBSERVACIONES.-

Caso 1.- S.O.P. H. 67 años.

Diabética. Comenzó el 20-XI-1972 con astenia y anorexia progresivas. Quince días más tarde coluria e ictericia - por lo que fué ingresada. El 7-XII-1972 en los primeros análisis practicados, presentó TGO > 250 mU/ml.^a) bilirrubina > 10 mgrs. y AgHB positivo. La última determinación de Ag HB positiva fué el 9-I-1973. Diez días más tarde el Ag HB era negativo y el resto de los parámetros bioquímicos prácticamente normales. Entonces no se practicó determinación de Ac HB por HAP. Volvió a revisión en Septiembre de 1973, presentando TGO y bilirrubina normales y Ag HB y Ac HB negativos (repetidos - dos veces).

Caso 2.- E.M.S.T. H. 40 años.

Sus síntomas (astenia, anorexia, coluria e ictericia) comenzaron el 15-I-1973. Ingresó un mes mas tarde teniendo entonces TGO 295 U., bilirrubina total 8,8 mgrs. y Ag HB positivo. Este se negativizó el 7-III-1973 cuando las transaminasas habían descendido a 132 mU. y la bilirrubina total era de 1,76. Volvió a revisión el 6-VI-1973 teniendo entonces todas las pruebas bioquímicas (TGO, TGP, bilirrubina y fosfatasa alcalina) normales, Ag HB negativo y un título de Ac HB de 1/81. Una biopsia del 24-II-1973 mostraba un patrón de Hepatitis -- aguda viral.

Caso 3.- M.S.P. H. 88 años.

Hernia de hiatus y anemia ferropénica, siendo transfundida repetidamente en Noviembre y Diciembre de 1972. A -- principio de Abril de 1973, comenzó con un cuadro de Hepatitis aguda siendo el Ag HB positivo el 10-IV-1973. La bilirrubina llegó a 18 mgrs. el 24-IV-1973. El 14-XII-1973, vuelve a revisión encontrándose entonces todas las pruebas bioquímicas normales, Ag HB negativo y Ac HB de 1/81.

Caso 4.- H.C.B. H. 77 años.

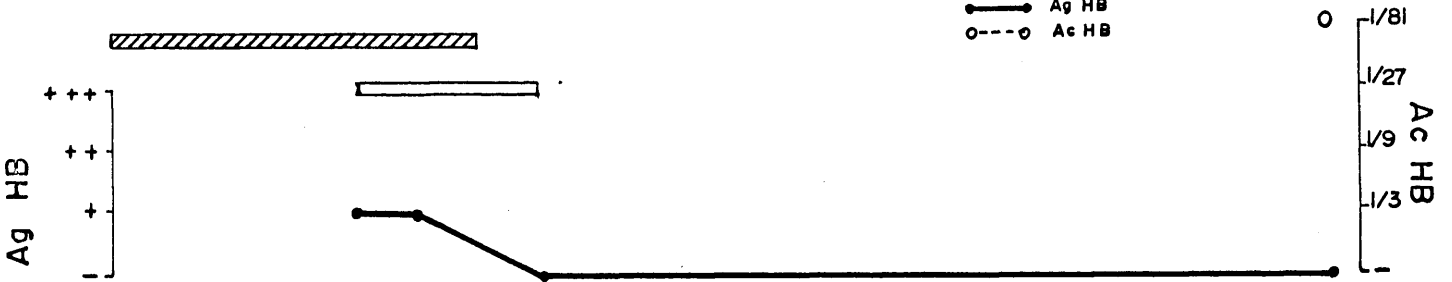
Diagnosticada de artrosis y diabetes. A primeros de Abril de 1973, comenzó con anorexia, dolor en hipocondrio derecho, hipocolia, coluria e ictericia. Ingresó el 10-IV-1973, presentando TGO 512 U. y bilirrubina superior a 10 mgrs. Esta llegó a ser de 27,3 mgrs. el 21-IV-1973. El Ag HB fué positivo a su ingreso negativizándose el 8-VI-1973 cuando la bilirrubina era de 3m4 y la TGO de 135. Los Ac HB se hicieron positivos el 19-VI-1973 (1/9), subiendo a 1/27, para negativizarse en la última determinación el 10-VII-1973.

- a) Las determinaciones de TGO se hicieron en un autoanálizador SMA 12-60 (Technicon) Con esta técnica las cifras normales son hasta 50 mU., no dando valores mayores de 250 mU. En algunos casos en que se sobrepasaba esta cifra las determinaciones se hicieron mediante el método de -- Reitman-Frankel (normal hasta 25 U.)

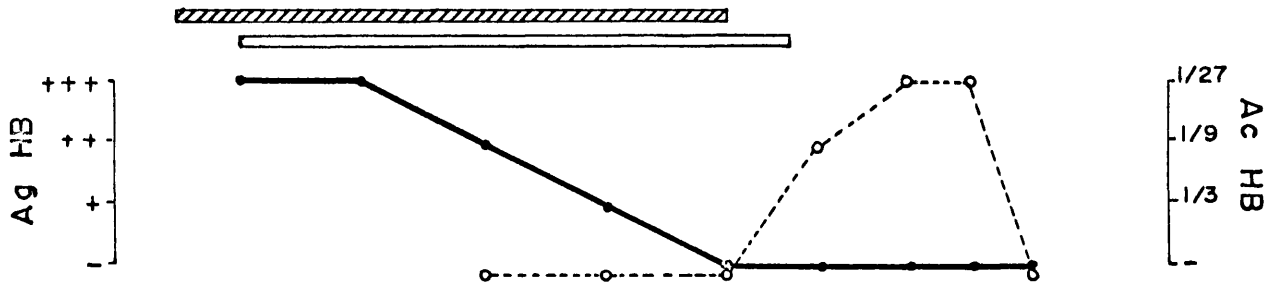
HEPATITIS B

—|— = 1 semana

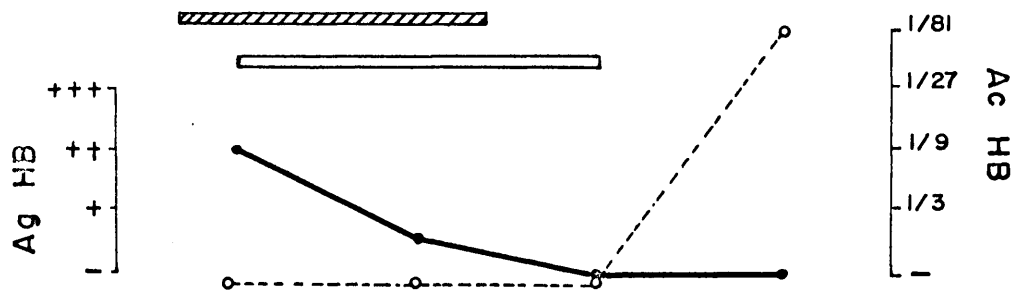
▨ Ictericia
 □ TGO > 100 mU/ml
 ●—● Ag HB
 ○- - ○ Ac HB



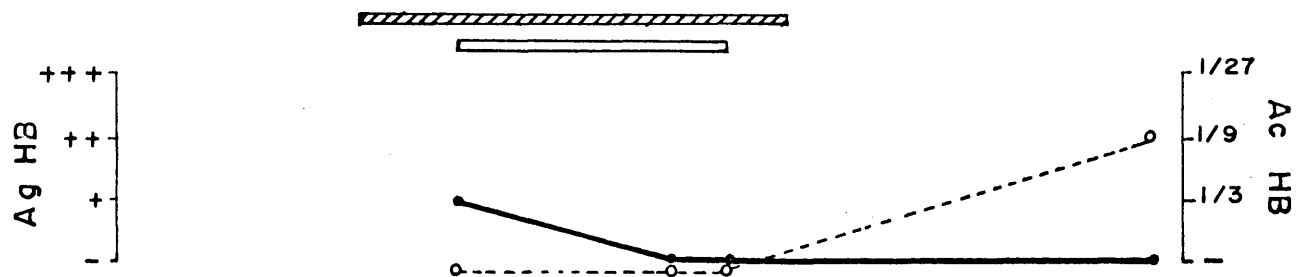
Caso nº 2: E.M.S.T. ♀ 40 años



Caso nº 4: H.C.B. ♀ 77 años



Caso nº 5: M.A.M.A. ♀ 22 años



Caso nº 6: M.S.P.Q. ♀ 73 años

Caso 5.- M.A.M.A. H. 22 años.

A.T.S. trabajando en quirófano. Comenzó con artralgias en la segunda quincena de Mayo de 1973. Poco después le apareció astenia, anorexia, coluria, e ictericia, siendo positivo el Ag HB en la primera determinación el 1-VI-1973, negativizándose el 10-VII-1973, quince días después de desaparecer la ictericia y cuando la TGO era de 96 mU. Los Ac HB fueron sólo positivos en la última determinación el 31-VII-1973. (1/81).

Caso 6.- M.S.P.Q. H. 73 años.

Comienza a principios de Mayo de 1.973 con astenia y anorexia. Hacia el 15-V-1973, coluria y dolores articulares en hombros, codos, muñecas y tobillos. Desde el 1-VI-1973 ictericia y pocos días más tarde prurito. Ingresa el 9-VI-1973 presentando TGO > 250 mU. Bilirrubina total 4,2 y Ag HB positivo. La bilirrubina llegó a 15,8 el 22-VI-1973. El Ag HB se negativizó el 3-VII-1973 cuando aún persistían alteraciones bioquímicas importantes. Los Ac HB fueron negativos durante su ingreso, encontrándose sin embargo un título de 1/9 al volver a revisión en el mes de Septiembre cuando se encontraba clínica y analíticamente normal.


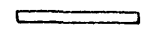


Caso 7.- B.M.G. H. 25 años.



A.T.S. trabajando en la unidad de hemodiálisis. En Mayo de 1972, tuvo un cuadro de hepatitis aguda que duró 15 días con TGO > 250 mU. y bilirrubina total de hasta 5,6 mg. El Ag HB fué negativo y curó sin dejar secuelas. A principios de Junio de 1973, comenzó de nuevo con un cuadro similar siendo en esta ocasión el Ag HB positivo durante cuatro semanas. No llegó a tener ictericia, pero la TGO, normal con los primeros síntomas, fué luego superior a 250 mU. durante 15 días. La determinación de Ac HB fué positiva por primera vez el 27-VII-1973 (1/27), persistiendo a título menor hasta la última determinación el 11-VIII-1973.

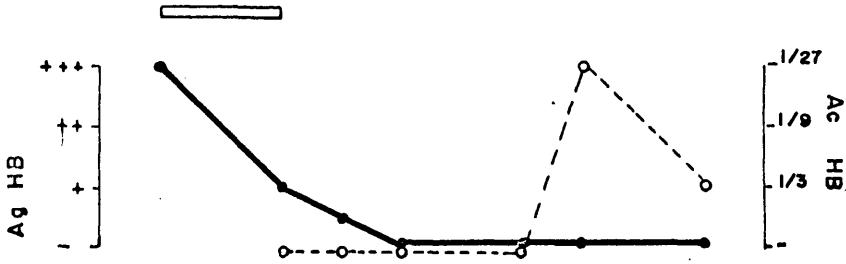
Caso 8.- M.D.A.E. H. 37 años.

Comienza el 4-VI-1973 con náuseas, febrícula, vómitos biliosos y dolores abdominales difusos. Cuatro días después coluria, ictericia y prurito. Ingresa el 14-VI-1973 y en los primeros análisis tiene TGO > 250 mU. y bilirrubina total -- 13,6 mgrs. La ictericia desaparece al cabo de quince días pero la TGO permanece elevada hasta su alta el 12-VII-1973. Vuelve el 20-VII-1973, totalmente asintomática pero no se hace los análisis que se la solicitan. El Ag HB es positivo desde su ingreso hasta el 12-VII-1973 y los Ac HB son negativos en todas las determinaciones.

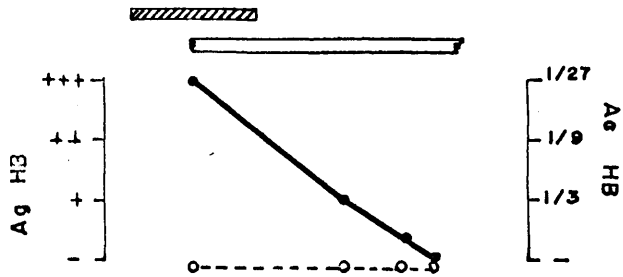
HEPATITIS B

 Ictericia
 TGO > 100U/ml
 Ag HB
 Ac HB

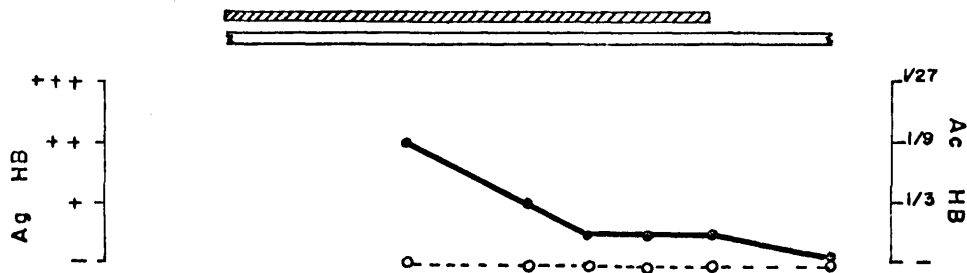

 1 semana



Caso nº 7: B.M.G. ♀ 25 años

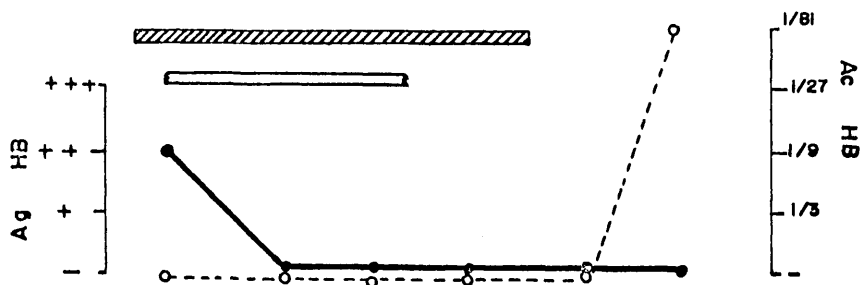


Caso nº 8: M.D.A.E. ♀ 37 años



10 meses despues
 Ag HB# Ac HB: 1/3

Caso nº 9: R.D.G. ♂ 28 años



Caso nº 12: J.G.B. ♂ 52 años

Caso 9.- R.D.G. V. 28 años.

Cirujano. Comenzó con artralgias el 15-V-1973. Poco después astenia y anorexia y desde principios de Junio ictericia, se le encontró entonces TGO: 500 U. El primer Ag HB se le practicó el 22-VI-1973 siendo positivo, persistiendo así hasta el 28-VII-1973. Entonces le desapareció también la ictericia y dos semanas después la TGO bajó de 100 mU. - Entonces los Ac HB eran aún negativos. En Abril de 1974 se le repitieron todas las determinaciones que fueron normales con Ag HB negativo y Ac HB positivos (1/3).

Caso 10.- C.G.R. H. 51 años.

Operada de un mesotelioma epiploico en 19-II-1973.. Ingresa el 24-VI-1973 por padecer una ciática, siendo entonces las determinaciones bioquímicas normales. Diez días más tarde comienza con astenia, coluria e ictericia, elevándose la TGO (> 250 mU.) y la bilirrubina (7,1 mgrs.). El Ag HB es entonces positivo. Es dada de alta y al volver a revisión dos meses después el Ag HB es negativo y el resto de los parámetros normales. Las dos determinaciones de Ac HB prácticas son negativas (5-VII-1973 y 6-IX-1973).

Caso 11.- C.M.R. H. 22 años.

Ingresa el 15-IX-1973 refiriendo ictericia desde 10 días antes. Tiene entonces TGO > 250 mU., bilirrubina > 10 mgrs. y Ag HB positivo. El 6-X-1973 la TGO es de 200 mU., bilirrubina 1,76 y Ag HB negativo. Los Ac HB son entonces de 1/9. Dos meses después vuelve a revisión asintomática siendo todos los datos analíticos normales. No se le hacen Ag ni Ac HB en esta revisión.

Caso 12.- J.G.B. V. 52 años.

Enfermo polivalvular, operado en Junio de 1973 poniéndole prótesis mitral y aórtica y haciéndole comisurotomía y anuloplastia tricúspide. Reingresa el 30-X-1973 habiendo desaparecido la ortopnea y los edemas, pero con náuseas, astenia, anorexia, coluria, e ictericia desde 7 días antes. Tiene TGO > 250 mU. bilirrubina > 10 mgrs. y Ag HB positivo. El Ag HB se negativiza quince días más tarde cuando aún persisten las transaminasas muy elevadas y la bilirrubina superior a 10 mgrs. Posteriormente mejora siendo dado de alta el 3-XII-1973 con TGO 75 mU. y bilirrubina 4,5 mgrs. Sigue repitiéndose semanalmente Ag y Ac HB persistiendo el primero siempre negativo y apareciendo un título de Ac de 1/81 el 26-XII-1973. Vuelve a revisión en Febrero de 1974 presentando una bioquímica normal, pero esta vez no se repite Ag y Ac HB.

Caso 13.- J.V.O. V. 28 años.

Comienza con astenia, anorexia, coluria e ictericia hacia el 20-X-1973. Viene a consulta el 31-X-1973 presentando TGO > 250 mU., bilirrubina > 10 mgrs. Ag HB positivo y Ac - HB negativos. Se le manda tratamiento volviendo asintomático el 18-II-1974. Entonces las transaminasas y la bilirrubina son normales el Ag HB negativo y tiene un título de Ac HB de 1/27.

Caso 14.- J.P.L.G. V. 27 años.

Cirujano cardiovascular sufrió un pinchazo con una aguja interviniendo a un enfermo Ag HB positivo en Julio de 1973. A principios de Noviembre comienza con molestias en el hipocondrio derecho, náuseas, astenia y coluria. El 11-XI-1973 nota ictericia conjuntival. Ingresa el 14-XI-1973 con TGO -- 370 U., bilirrubina 4,2 mgrs. y Ag HB positivo. La ictericia desaparece el 17-XII-1973. El Ag HB se negativiza el 22-I-1974, coincidiendo con TGO: 90 mU. Los Ac HB son negativos - en las siete determinaciones realizadas entre el 14-XI-1973 y el 22-I-1974.

Caso 15.- T.S.S. H. 23 años.

Empleada en la unidad de hemodiálisis. En Agosto de 1973 en unos análisis de control tiene transaminasas, bilirrubina y fosfatasa alcalina normales, Ag HB negativo y un título de Ac HB 1/3. El 15-XI-1973 coincidiendo con una epidemia de hepatitis B. en los enfermos de la unidad, comienza con astenia, mialgias y artralgias. El 19-XI-1973 se le practica un Ag HB que resulta positivo. El 22-XI-1973 le aparece coluria y pocos días más tarde hipocolia, ictericia y prurito. Entonces tiene TGO 405 U. y bilirrubina 0,8 mgrs. Esta sube a 8,6 mgrs. el 3-XII-1973. El Ag HB se negativiza el 10-XII-1973. El 17-XXII-1973, le desaparece la ictericia. La --- TGO es entonces de 105 mU. Se repite determinaciones en Enero Febrero y Marzo que son normales. La primera determinación de Ac HB practicada el 23-XI-1973 es de 1/81. Se le repiten otras seis que son todas positivas. (Títulos 1/27, 1/81) la última el 12-VI-1974.

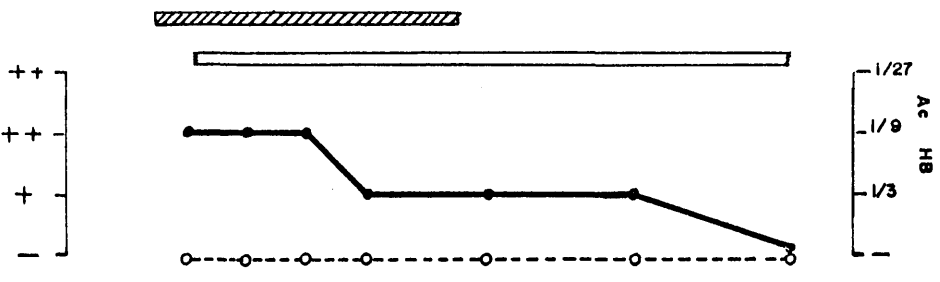
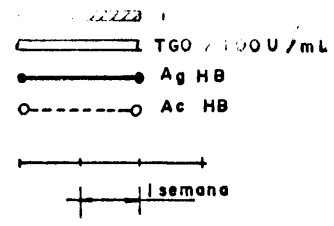
Caso 16.- R.F.B. H. 18 años.

A finales de Noviembre de 1973 comienza con náuseas, astenia, anorexia, coluria e ictericia. Es vista el 10-XII-1973, presentando TGO > 250 mU., bilirrubina > 10 mgrs. Ag HB positivo y Ac HB negativos. La ictericia le desaparece diez días más tarde teniendo el 22-XII-1973 TGO 85 mU. Ag HB negativo y Ac HB 1/27.

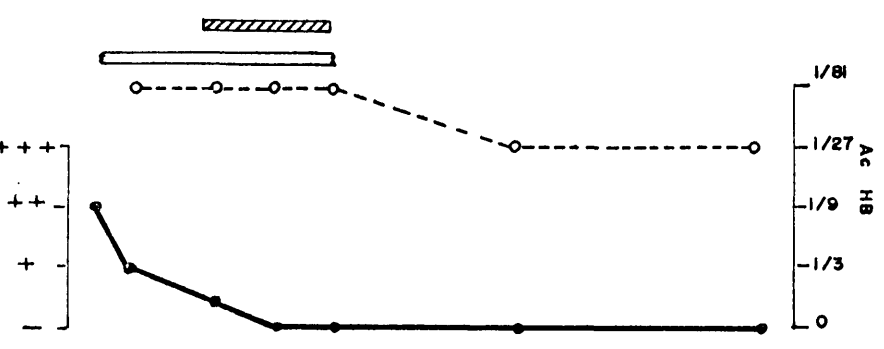
Caso 17.- J.M.M.R. V. 18 años.

Novio de R.F.B. (caso 16). A finales de Diciembre de 1973 presenta astenia y fiebre de 38-39°C. Le encuentran entonces TGO 240 mU., bilirrubina 0,5 mgrs. y Ag HB positivo. -

HEPATITIS B

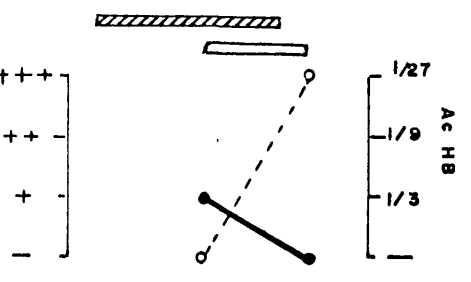


Caso nº 14: J.P.L.C. ♂ 27 años

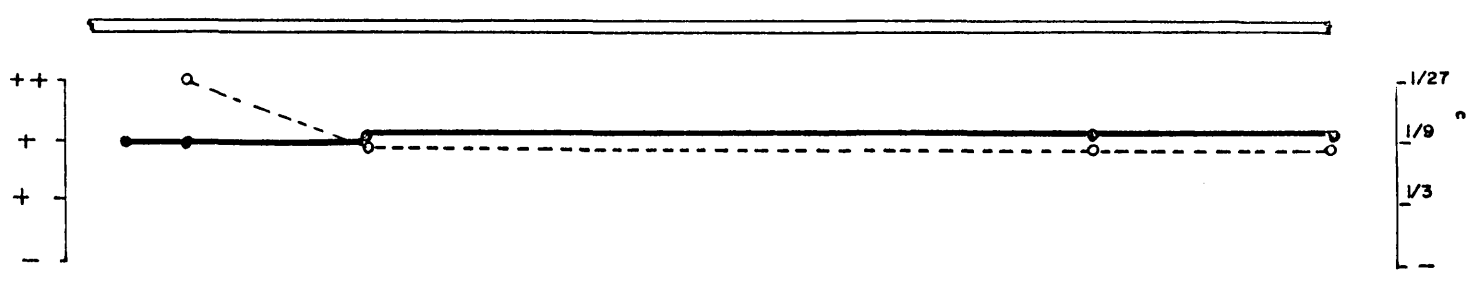


3 meses antes :
 Ag HB: 0 Ac HB: 1/3
 4 meses despues :
 Ag HB: 0 Ac HB: 1/27

Caso nº 15: T.S.S. ♀ 23 años



Caso nº 16: R.F.B. ♀ 18 años



Caso nº 17: J.M.M.R. ♂ 18 años

Es diagnosticado de hepatitis aguda. Al cabo de algunos días queda asintomático pero en sucesivas revisiones el Ag HB persiste positivo y las transaminasas elevadas. La bilirrubina siempre normal. Cinco determinaciones de Ac HB (entre el 7-I-1974 y el 11-VI-1974) son positivas (títulos entre 1/9 y 1/27). Por una biopsia realizada el 15-VI-1974 es diagnosticado de hepatitis aguda prolongada.

Caso 18.- C.M.P. V. 60 años.

El 20-I-1974 comienza con coluria, hipocoloia y tres días más tarde ictericia. El 7-II-1974 se le encuentran TGO > 250 mU., bilirrubina > de 10 y Ag HB positivo. Entonces los Ac HB son negativos. Vuelve a revisión el 2-IV-1974 contando que le desapareció la ictericia un mes antes y se encuentra asintomático. La bioquímica es entonces normal el Ag HB negativo y tiene un título de Ac HB de 1/9.

Caso 19.- I.G.L. H♀ 43 años.

Intervenida el 16-XI-1973 colocándosele una prótesis mitral. A principios de Febrero de 1974 comienza con febrícula, artralgias, mialgias, astenia y anorexia. Pocos días más tarde ictericia. Viene a consulta el 15-II-1974, presentando TGO 250 mU. Bilirrubina 10 mgrs. y Ag HB positivo. En los días siguientes la TGO llega a 525 U. y la bilirrubina a 26,4 mgrs. El 6-III-1974 se negativiza el Ag HB y el 20-III-1974 es dada de alta con TGO 126 mU., bilirrubina 6,6 mgrs. y Ag y Ac HB negativos. El 26-VI-1974 vuelve a revisión asintomática y con bioquímica normal. No se le repiten Ag ni Ac HB.

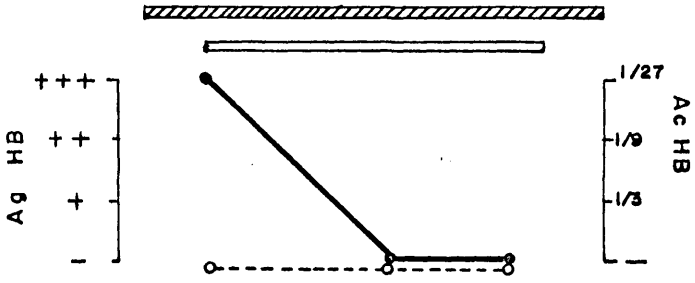
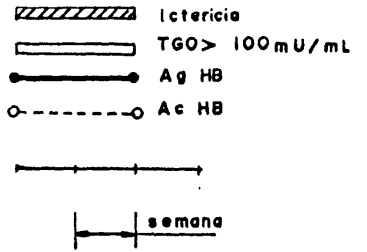
Caso 20.- C.R.G. H. 52 años.

En la segunda quincena de Febrero de 1974 comienza con anorexia, dolores articulares y molestias en hipocondrio derecho. El 1-III-1974 coluria y ictericia. Ingresa el 18-III-1974, con TGO > 250 mU., bilirrubina 17,6 mgrs., y Ag HB positivo. Este se negativiza el 27-III-1974 cuando tenía TGO 268 U. y bilirrubina 7,26 mgrs. Es dada de alta el 15-IV-1974 con TGO 153 mU. y bilirrubina 2,4 mgrs. Vuelve a revisión el 25-V-1974 asintomática y con una bioquímica normal. Los Ac HB se hacen positivos el 3-IV-1974 siendo de nuevo negativos el 25-V-1974.

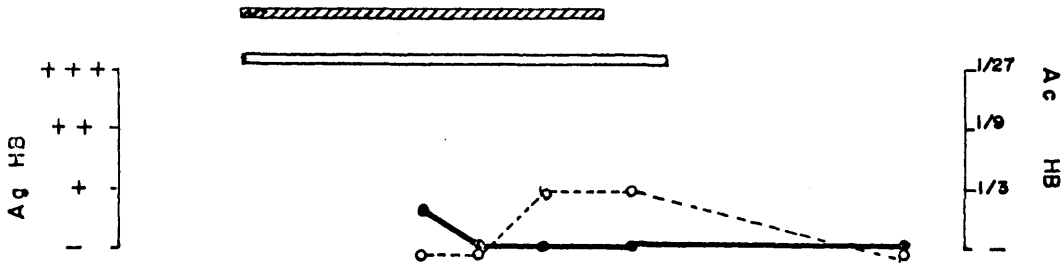
Caso 21.- R.P.B. V. 58 años.

Comienza el 15-III-1974 con astenia y anorexia y -- cinco días más tarde, orinas oscuras, hipocoloia e ictericia. Ingresa el 5-V-1974 con TGO > 250 mU. Bilirrubina 25,96 mgrs. y Ag HB positivo. Este se negativiza tres semanas más tarde

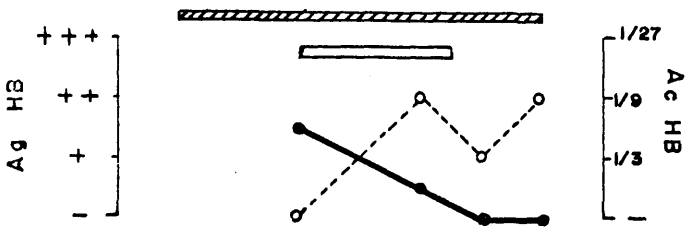
HEPATITIS B



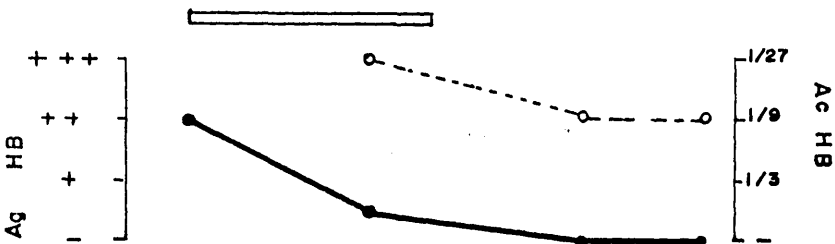
Caso nº 19: I.G.L. ♀ 43 años



Caso nº 20: C.R.G. ♀ 52 años



Caso nº 21: R.P.B. ♂ 58 años



Caso nº 22: M.P.J. ♀ 23 años

cuando tiene TGO 60 mU. y bilirrubina 6,16 mgrs. Vuelve a revisión el 22-VII-1974 asintomático siendo todos los datos -- analíticos normales. Los Ac HB se hacen positivos (1/9) el 20-IV-1974 cuando aún permanece el Ag HB positivo, continuando con título entre 1/3 y 1/9 cuando éste ya se ha negativizado.

Caso 22.- M.P.J. H. 23 años.

Enfermera. En 1969 tuvo una hepatitis aguda: con -- transaminasas elevadas durante varios días, entonces no se le practicó determinación de Ag HB. En 1971 se hizo unos análisis teniendo transaminasas, bilirrubina y retención de B.S.P. normales y antígeno HB negativo. A principios de Marzo de -- 1974, comenzó con astenia, anorexia, náuseas y molestias en hipocondrio derecho, encontrándosele TGO 250 mU. y Ag HB positivo. El 28-III-1974 persisten las transaminasas elevadas y el Ag HB positivo, normalizándose ambos parámetros al repetirse los análisis el 22-IV-1974. En las tres determinaciones de Ac HB (28-III-1974, 22-IV-1974 y 6-V-1974), presenta títulos entre 1/9 y 1/27. No tuvo ictericia en ningún momento. En una biopsia practicada el 30-IV-1974 se observó un cuadro residual de hepatitis. Al volver a revisión en Julio de 1974, - la determinación de Ag HB fué positiva. Estaba asintomática - y con TGO 65 mU. y retención de B.S.P. del 8% a los 45 mn.

Caso 23.- M.P.A. H. 42 años.

Su marido que padece una insuficiencia renal terminal estuvo dializándose en la unidad de la F.J.D. en Octubre de 1973, pasando posteriormente a dializarse en su domicilio. A finales de Marzo de 1974, ella comenzó con coluria e ictericia encontrándosele en Abril TGO 365 U., bilirrubina 6,5 - y Ag HB positivo. Un mes más tarde la TGO era 44 mU. y la bilirrubina 0,8 mgrs. En Junio estas cifras persistían dentro de límites normales y el Ag HB era negativo. Las dos determinaciones de Ac HB (6-IV-1974 y 12-VI-1974) fueron ambas positivas a un título de 1/9. En Abril de 1974 se determinó el Ag HB a su esposo siendo también positivo y habiendo permanecido así hasta la actualidad, siempre con TGO y bilirrubina normales (Ver caso 38).

Caso 24.- A.G.P. H. 29 años.

Padece un asma extrínseco desde 3 años antes. El 10-V-1974 ingresa por padecer una crisis asmática encontrándosele TGO 150 mU., bilirrubina 1,6 mgrs. y Ag HB positivo. Los Ac HB son negativos. Vuelve a revisión dos meses más tarde habiéndosele normalizado las pruebas bioquímicas y negativizado el Ag HB. No se repiten Ac HB.

Caso 25.- A.M.L. H. 49 años.

Intervenda de un quiste hidatídico hepático el 21-XI-1973. El 1-IV-1974 comienza con astenia, anorexia, e ictericia. Ingresa el 6-IV-1974, presentando TGO > 250 mU. bilirrubina 9,8 mgrs. y Ag HB positivo; la ictericia desaparece el 7-V-1974 persistiendo aún TGO alto y Ag HB positivo. Ambos se normalizan dos semanas más tarde. Cuatro determinaciones de Ac HB entre el 6-IV-1974 y el 21-V-1974 dan títulos superiores o iguales a 1/243.

Caso 26.- A.B.B. H. 24 años.

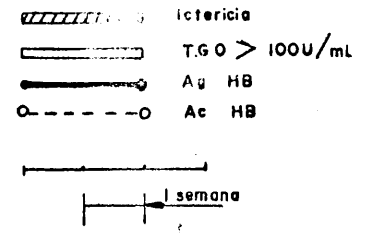
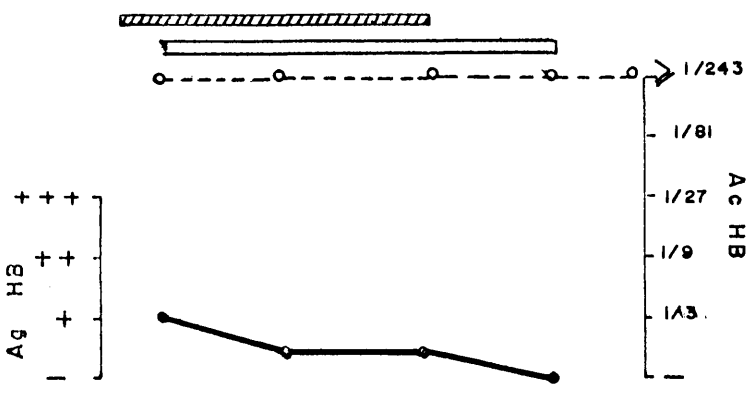
Encargada de la limpieza de material de los departamentos de Bacteriología y desde hacía algunos meses de Inmunología. Embarazada. En Enero de 1974 en unas determinaciones de control muestra Ag HB y Ac HB negativos. El 1-IV-1974 comienza con dolores articulares, astenia, anorexia, vómitos y coluria. Días más tarde eritema en piernas durante cuatro días, hipocolia e ictericia. Ingresa el 15-IV-1974, presentando TGO > 250 mU., bilirrubina 7,9 mgrs. y Ag HB positivo. La ictericia cede quince días más tarde, bajando la TGO a -- 120 mU. El Ag HB después de negativizarse el 29-IV-1974, --- vuelve a ser débilmente positivo el 7-V-1974 y se negativiza definitivamente el 30-V-1974. Cinco determinaciones de Ac HB son todas negativas. El 16-VI-1974 da a luz una niña normal con Ag y Ac HB negativos.

Caso 27.- J.G.B. V. 27 años.

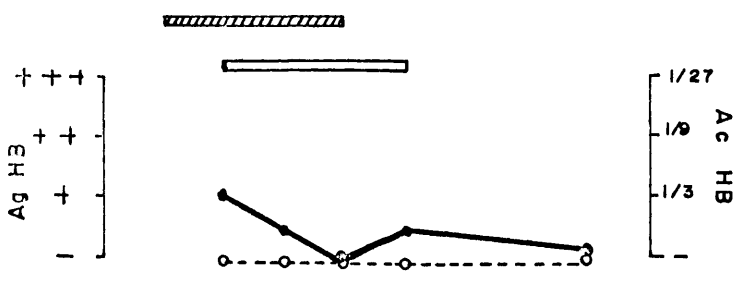
El 12-IV-1974 comienza con astenia, anorexia, cefaleas, náuseas, dolores articulares en muñecas, urticaria y coluria. Cuatro días más tarde ictericia. Viene a consulta el 18-IV-1974 presentando Ag HB positivo TGO 455 U. y bilirrubina 13,64 mgrs. Un mes más tarde desaparece la ictericia siendo la TGO 83 mU. y bilirrubina 2,86 mgrs. El 10-VI-1974 el Ag HB es negativo, TGO 52 mU. y bilirrubina 1,9 mg. Tres determinaciones de Ac HB entre el 18-IV-1974 y el 10-VI-1974 son negativas.

Caso 28.- A.M.M. V. 29 años.

Enfermo con insuficiencia mitral al que se le practica una anuloplastia en Octubre de 1973. El 10-IV-1974 comienza con astenia y cuatro días más tarde ictericia. Ingresa el 22-IV-1974 presentando TGO 250 mU. bilirrubina 10 mgrs. y Ag HB positivo. La bilirrubina llega a 15,4 mgrs. el 29-IV-1974. La ictericia desaparece el 21-V-1974 coincidiendo con el primer Ag HB negativo. Por entonces aún persisten TGO > 250 mU. Cinco determinaciones de Ac HB entre el 22-IV-1974 y el 21-V-1974 son positivas a títulos entre 1/9 y 1/27.

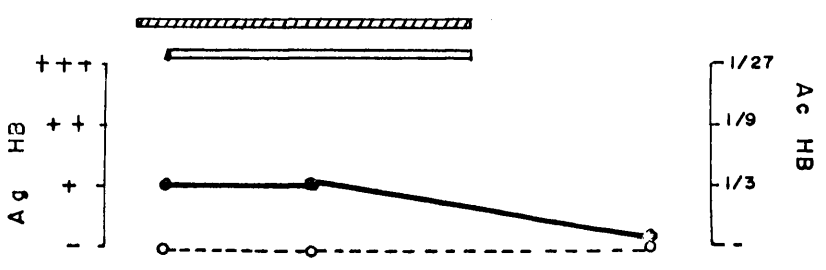


Caso nº 25 : A.M.L. ♀ 49 años

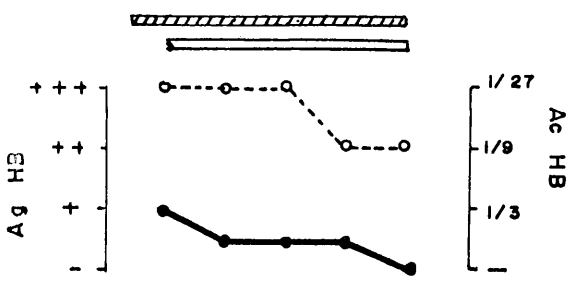


Ag y Ac negativos cuatro meses antes

Caso nº 26 : A.B.B. ♀ 24 años



Caso nº 27 : J.G.B. ♂ 27 años



Caso nº 28 : A.M.M. ♂ 29 años

Caso 29.- O.M.C.C. V. 32 años.

Comenzó a mediados de Abril de 1974 con astenia, anorexia, coluria, hipocolia e ictericia. Viene a consulta el 3-V-1974, presentando TGO 425 U., colemia 6,68 mgrs. y Ag HB positivo. La determinación de Ac HB fué negativa. Vuelve a revisión el 3-VI-1974., totalmente asintomático. Tiene entonces TGO 20 mU. y bilirrubina 0,8 mgrs. No se repitió Ag ni Ac HB.

Caso 30.- P.M.A. H. 22 años.

De profesión A.T.S. Había trabajado en banco de sangre hasta Mayo de 1.973. El 30-III-1974 dió a luz. A mediados de Mayo de 1974, comenzó con astenia, anorexia, e ictericia. Viene a consulta el 10-VI-1974; TGO > 250 mU. bilirrubina 3,5 mgrs. y Ag HB positivo. El 17-VI-1974 la TGO es de 150 mU. y el Ag HB se ha negativizado. Los Ac HB fueron positivos a un título de 1/243 en dos determinaciones (10-VI-1974 y 17-VI-1974.)).

Enfermos en programa de hemodiálisis periódicas.-

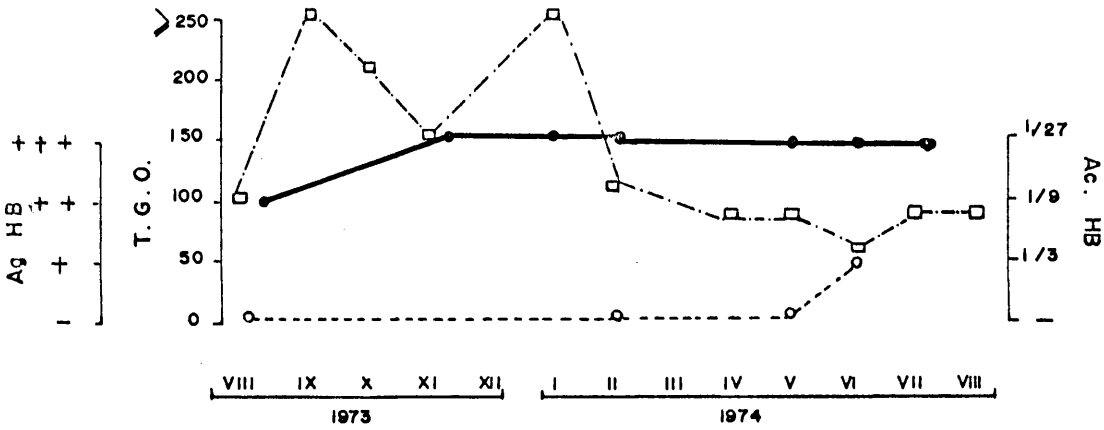
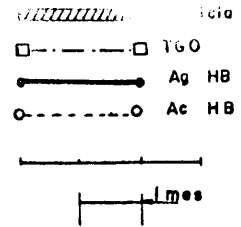
Caso 31.- A.S.F. H. 26 años.

Comenzó a dializarse en la unidad en Diciembre de 1969; transplantada el 10-III-1970. Rechazó el riñón en Febrero de 1972. En un análisis de control de Agosto de 1973 aparece TGO 100 mU. Se le practicó entonces un Ag HB que resultó positivo no habiéndose negativizado hasta la actualidad. No se ha puesto amarilla ni ha tenido sintomatología de hepatitis. La bilirrubina total no ha sobrepasado 1,5 mgrs. (Febrero de 1974). Las determinaciones de Ac HB han sido siempre negativas menos una con un título de 1/3 (Junio de 1974) (ver gráfica).

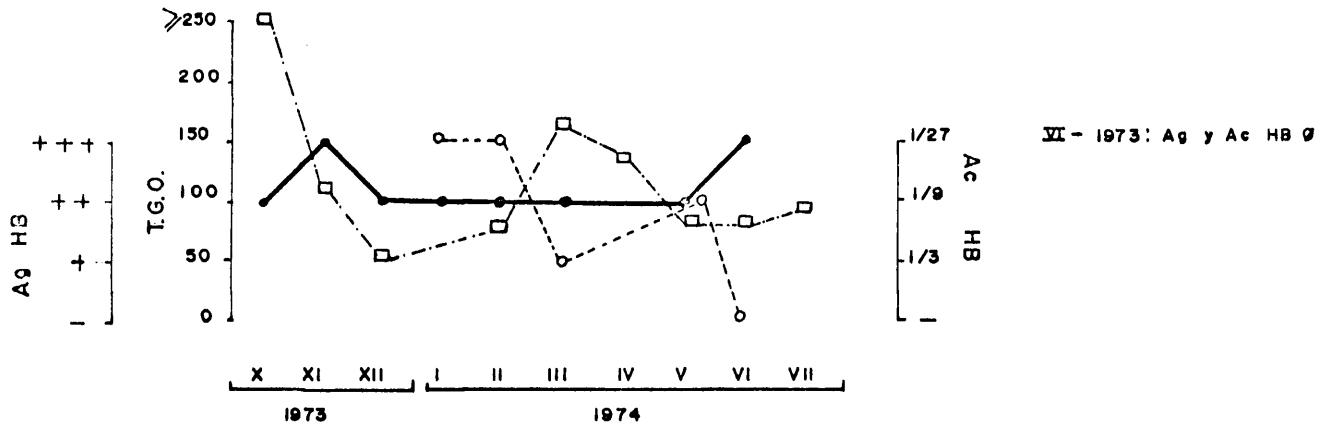
Caso 32.- R.M.L. H. 35 años.

Entró a dializarse en la unidad en Abril de 1973. En Junio de 1973 comenzó con febrícula vespertina que no se consiguió filiar pese a numerosas exploraciones. Entonces la TGO era normal y Ag y Ac HB negativos. En Octubre (continúa con la febrícula) le apareció TGO > 250 mU. Un antígeno practicado entonces fué positivo. En Noviembre se le practica una biopsia hepática observándose una hepatitis crónica persistente y una granulomatosis epitelioides no necrotizada. La bilirrubina total ha estado siempre dentro de límites normales y no ha tenido sintomatología de hepatitis. La febrícula desapareció con tratamiento antituberculoso. El Ag HB no

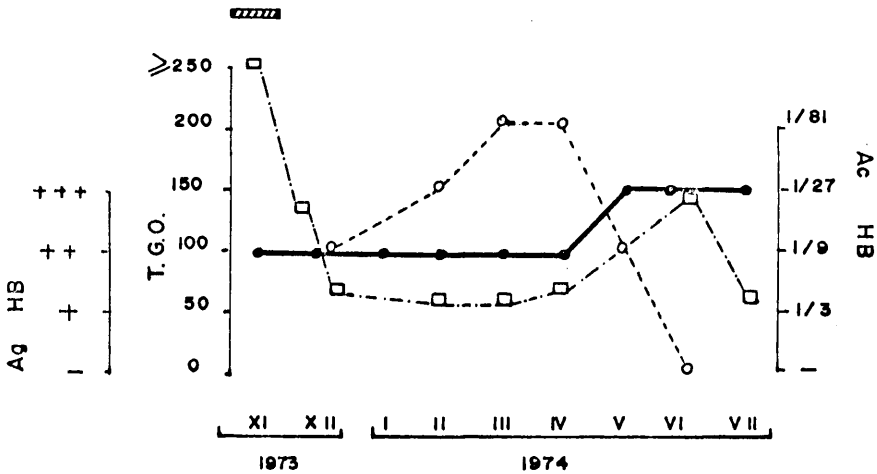
HEPATITIS B



Caso nº 31: A.S.F. ♀ 26 años

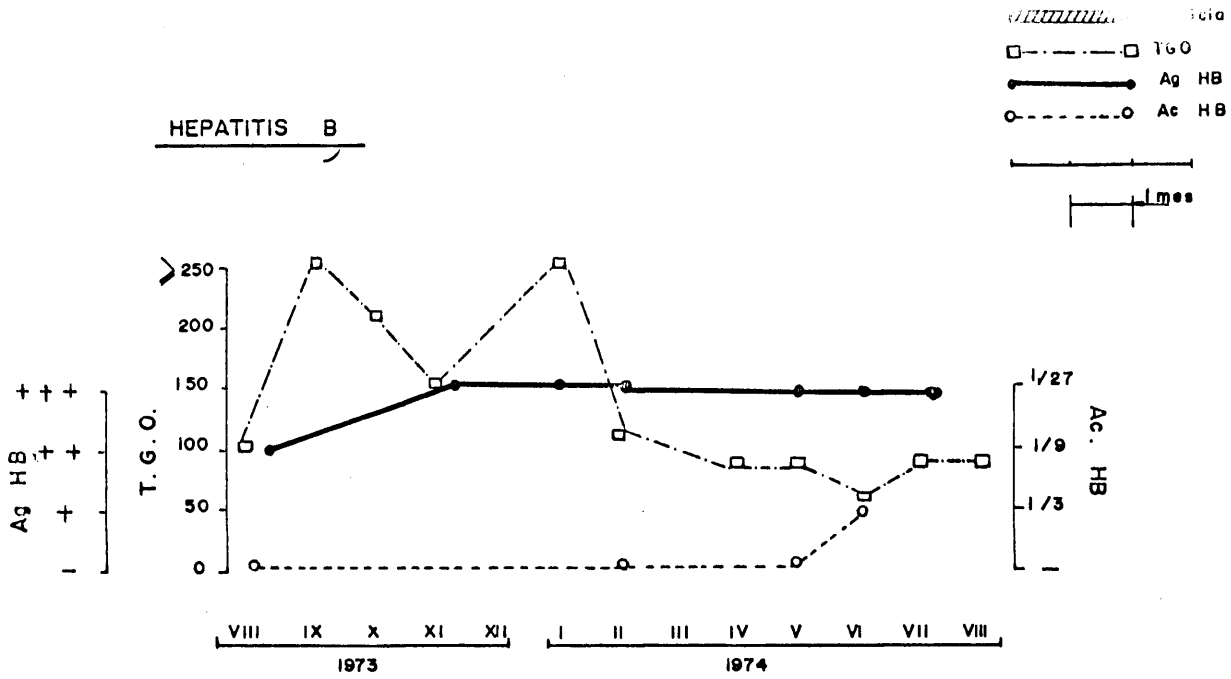


Caso nº 32: R.M.L. ♀ 35 años

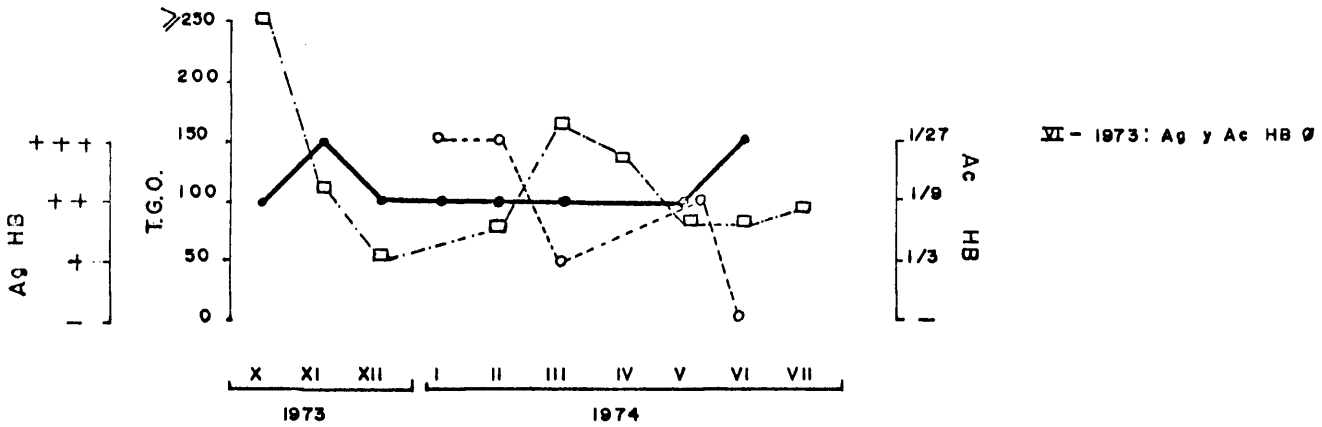


Caso nº 33: G.P.R. ♀ 33 años

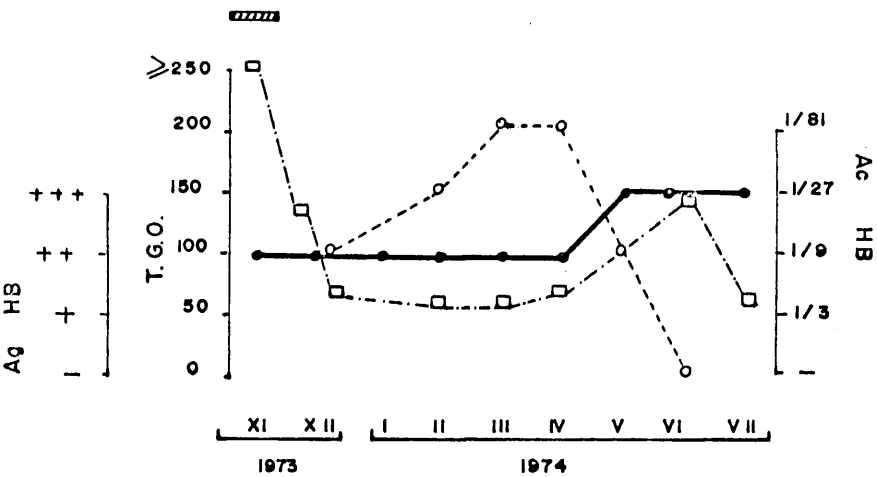
HEPATITIS B



Caso nº 31: A.S.F. ♀ 26 años



Caso nº 32: R.M.L. ♀ 35 años



Caso nº 33: G.P.R. ♀ 33 años

se ha negativizado. Los Ac HB fueron positivos por primera vez en Enero de 1974 (ver gráfica).

Caso 33.- G.P.R. H. 33 años.

Entró en la unidad en Abril de 1973. El 12-VI-1973 recibe un riñón de su madre. Este deja de funcionar dos meses más tarde pasando de nuevo la enferma al programa de hemodiálisis. A principios de Noviembre de 1973 comienza con astenia y anorexia y pocos días más tarde ictericia conjuntival. Entonces se le encuentra TGO 260 U., bilirrubina 2,2 mgrs. y Ag HB positivo. La ictericia le desaparece al cabo de 3 semanas bajando las transaminasas. El Ag HB ha permanecido positivo; entre Diciembre de 1973 y Abril de 1974, presenta Ac HB detectables. (ver gráfica).

Caso 34.- S.A.P. V. 33 años.

Ingresó a principios de Noviembre de 1973 para -- transplante. Unos días más tarde, cuando llevaba cinco días de diálisis peritoneales comenzó con astenia, anorexia, e ictericia, encontrándosele TGO 405 U., bilirrubina 6,1 mgrs. y Ag HB positivo. Se le practicó una biopsia hepática que mostró una imagen de hepatitis aguda. La ictericia le desapareció al cabo de tres semanas, pero siguió con TGO de 250 mU. hasta finales de Enero de 1974 en que descendió a 85 mU coincidiendo con la negativización del Ag HB y la primera determinación positiva de Ac HB. A partir de entonces se -- normalizaron sus pruebas bioquímicas. El 4-IV-1974, fué --- transplantado. (Ver gráfica).

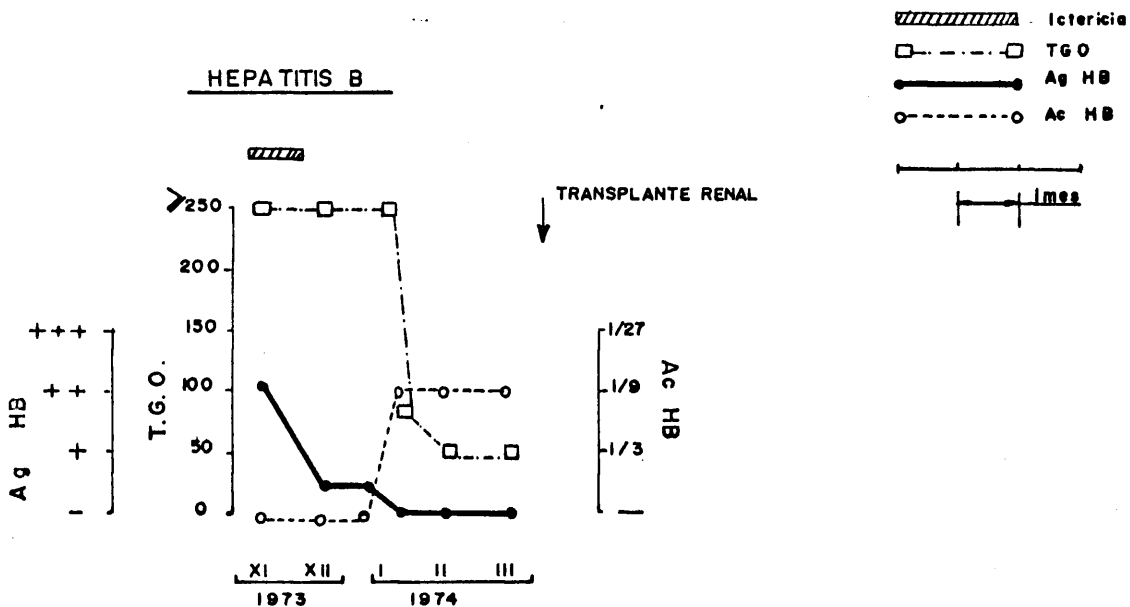
Caso 35.- P.N.I. V. 34 años.

Entró en el programa de diálisis en Agosto de 1971. En Abril de 1972 tuvo TGO 175 mU. siendo el Ag HB negativo. En Junio de 1973 tenía Ag y Ac HB negativos. En Noviembre de 1973 se le encontró TGO > 250 mU., practicándosele un nuevo Ag HB que resulta positivo. Una biopsia hepática el 10-XII-1973 muestra una imagen de hepatitis aguda. En Enero de 1974 le aparecen Ac HB detectables que persisten hasta la última determinación en Junio de 1974. El Ag HB también persiste positivo. No ha tenido ictericia. Las cifras de TGO han sido superiores a 200 mU. hasta Julio de 1974 (Ver gráfica).

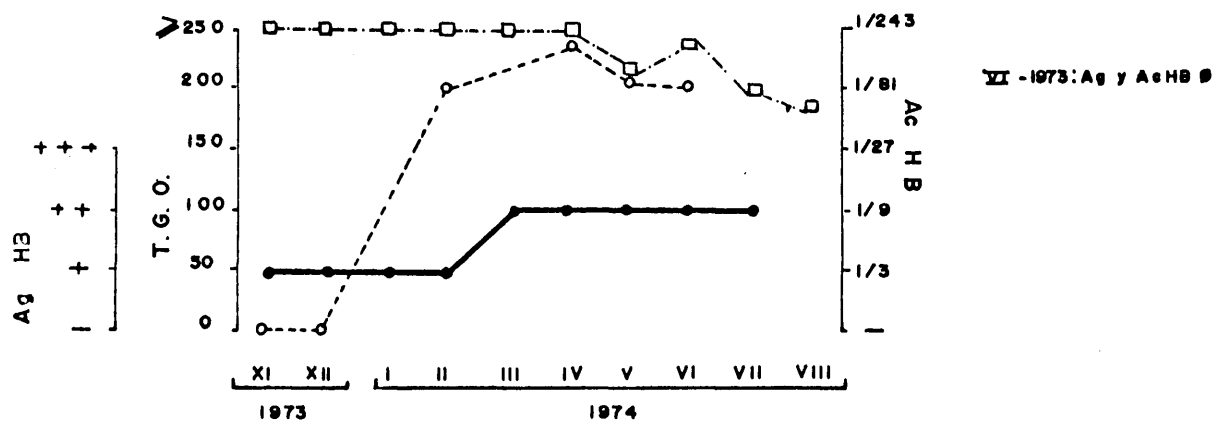
Caso 36.- M.R.C. V. 29 años.

Entró en la unidad de hemodiálisis en Marzo de 1973. En Junio y Noviembre de 1973 se le hicieron análisis de control en los que tenía TGO normal, Ag HB negativo y Ac HB a un título de 1/9 y 1/3 respectivamente. En Enero de 1974, se le encuentra TGO de 200 mU. y Ag HB positivo. Las cifras de

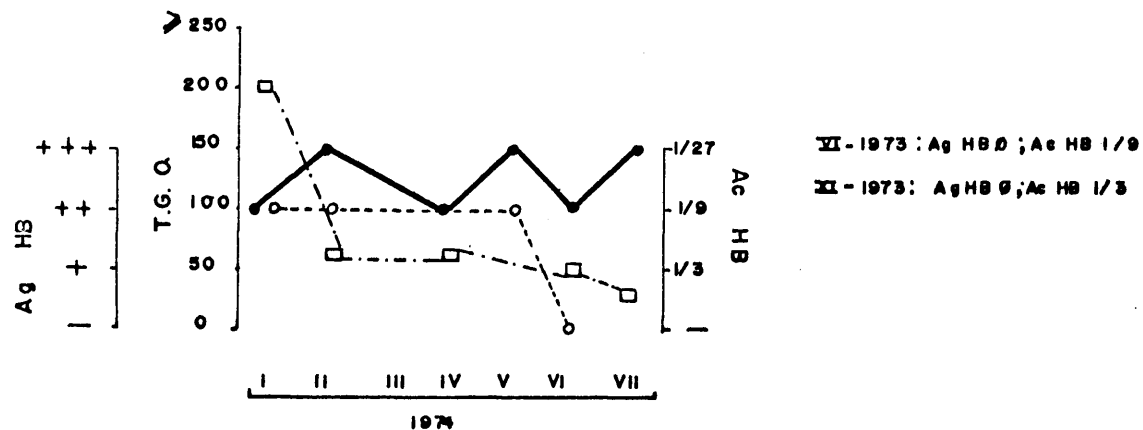
HEPATITIS B



Caso nº 34: S. A. P. ♂ 33 años



Caso nº 35: P.N.I. ♂ 34 años



Caso nº 36: M.R.C. ♂ 29 años

TGO son prácticamente normales a partir de Febrero de 1974, pero el Ag HB permanece positivo. Los Ac HB son positivos - entre Enero y Mayo y negativos en Junio de 1974. No ha tenido ictericia (Ver gráfica)

Caso 37.- E.R.P. V. 56 años.

Entró en la unidad en Septiembre de 1.973. Entonces tenía Ag y Ac HB negativos. En Febrero de 1974 presenta TGO 145 mU y Ag y Ac HB positivos. Desde Marzo el antígeno y Ac HB permanecen positivos y la TGO oscila entre 95 y 65 mU. - No ha tenido ictericia. (Ver gráfica).

Caso 38.- F.C.C. V. 45 años.

Acude a la Unidad en Octubre de 1973 pasando a dializarse en su domicilio al mes siguiente. En Abril de 1974 viene a revisión encontrándosele Ag HB positivo, la TGO es de 60 mU. En Mayo y Junio la TGO es normal y el Ag HB permanece positivo. Los Ac HB han sido positivos en Abril y Junio de 1974 (1/27 y 1/81 respectivamente). No ha tenido ictericia. (Ver gráfica).

Caso 39.- U.A.G. V. 53 años.

Entra en el programa de hemodiálisis en Diciembre de 1973. En Enero y Febrero de 1974, Ag y Ac HB son negativos. En Febrero, la TGO es mayor de 250 mU. En Mayo aparece Ag HB positivo y en Junio los Ac HB (1/27). No ha tenido ictericia (Ver gráfica).

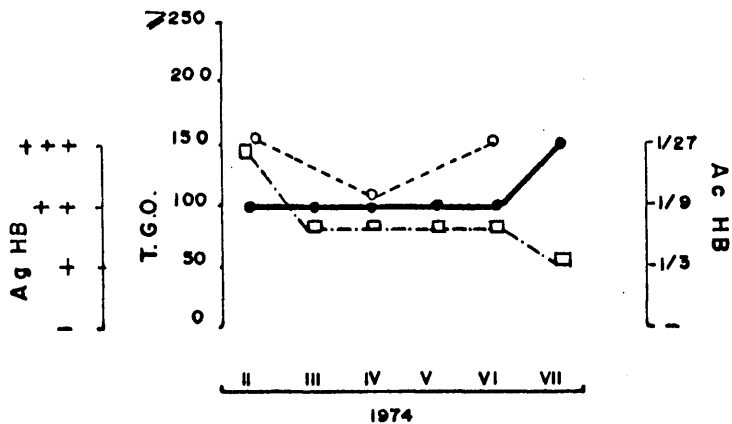
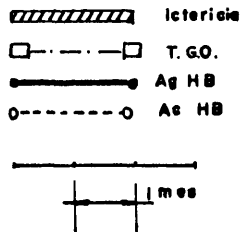
Caso 40.- J.D.M. V. 25 años.

Acude a la Unidad en Diciembre de 1973 pasando a dializarse en su propia casa en Marzo de 1.974. En Abril - viene a revisión haciéndose una hemodiálisis en la clínica. En Junio comienza con cansancio, vómitos e ictericia. Se le encuentra TGO 250 mU., bilirrubina 5,7 mgrs. y Ag HB positivo. En Julio cede el cuadro, normalizándose la TGO y la bilirrubina. El Ag HB permanece positivo. Los Ac HB fueron positivos en Febrero (1/9) y negativos en Marzo. En Junio - tiene un título de 1/27 (Ver gráfica).

Caso 41.- M.C.T. H. 32 años.

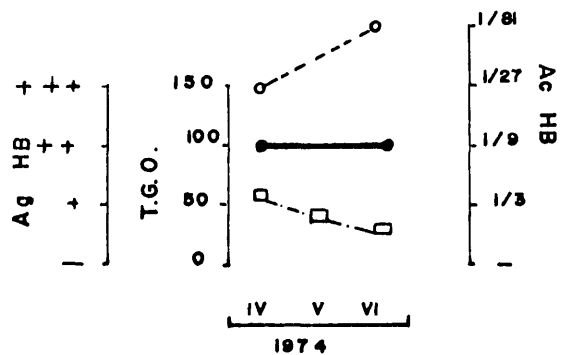
Entró en la unidad en Octubre de 1973. Desde Noviembre le han investigado Ag y Ac HB en siete ocasiones siendo siempre ambos negativos. El 30-VII-1974 el Ag HB se hizo positivo. La TGO ha sido siempre normal hasta Julio de 1974 -- (TGO > 250 mU.) No ha tenido sintomatología de hepatitis. -

HEPATITIS B

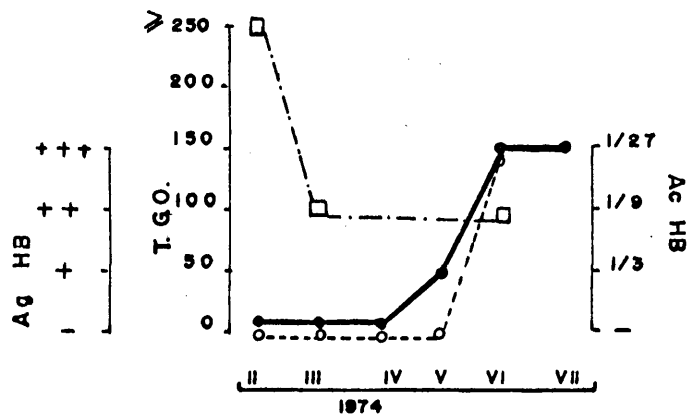


II-1973: Ag y Ac HB 0

Caso nº 37: E.R.P. O 57 años

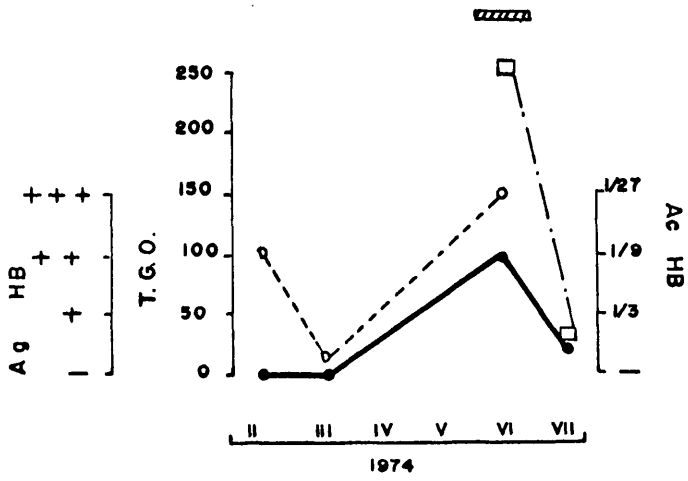


Caso nº 38: F.C.C. O 45 años

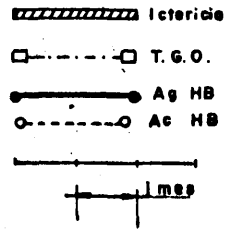


Caso nº 39: U.A.G. O 53 años

HEPATITIS B



Caso nº 40: J.D.M. O 25 años



Enfermos con trasplante renal funcionante.-

Caso 42.- J.M.R.R. V. 28 años.

Entró en el programa de hemodiálisis en Junio de 1969. El 18-I-1972 se le practicó un trasplante renal. - Desde entonces no ha recibido transfusiones. A finales de Julio de 1973 en unos análisis de control se le encontró TGO 250 mU. y Ag HB positivo. La TGO ha permanecido elevada desde entonces y el Ag HB no se ha negativizado. Han -- aparecido anticuerpos HB detectables por H.A.P. No ha teni do síntomas, ni se ha puesto icterico. (Ver gráfica).

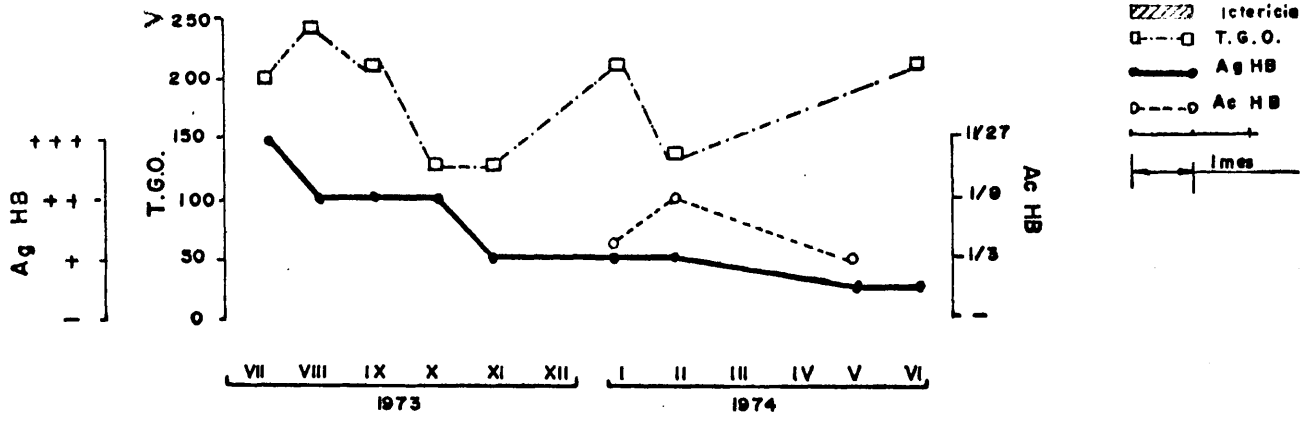
Caso 43.- T.N.I. H. 19 años.

Entró en el programa de hemodiálisis en Agosto de 1973. El 2-X-1973 es transplantada, encontrándosele un mes más tarde TGO 240 mU. y Ag HB positivo. Las transaminasas - se normalizaron en Enero de 1974, volviéndose a elevar en - Febrero. El Ag HB ha permanecido siempre positivo y desde - Diciembre de 1973 tiene Ac HB. En Junio de 1974 se le practi có una biopsia hepática que mostraba un patrón de hepatis aguda residual. (Ver gráfica).

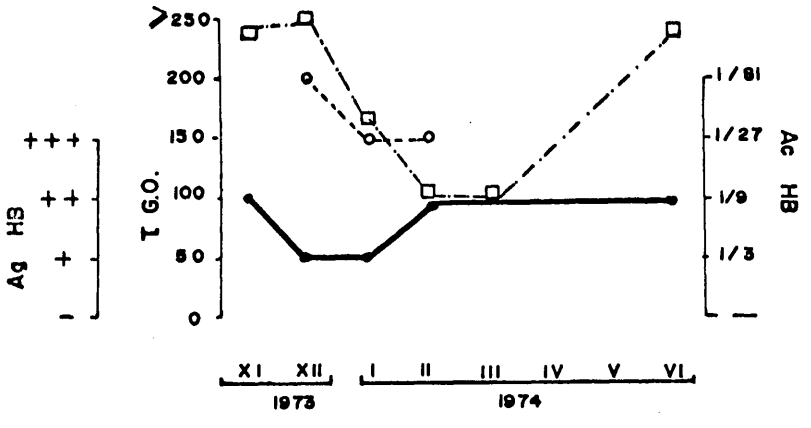
Caso 44.- A.D.G. H. 23 años.

Ingresa para trasplante en Abril de 1973, practi cándosele hemodiálisis periódicas a partir del 9-VI-1973. - Entonces tenía Ag y Ac HB negativos. El 10-VII-1973 es ---- transplantada. En Noviembre de 1973 presenta TGO > 250 mU. - y Ag HB positivo. Las transaminasas se normalizan un mes más tarde pero el Ag HB continuaba siendo positivo en Junio de - 1974. No se le practicaron Ac HB después de Junio de 1973. (Ver gráfica).

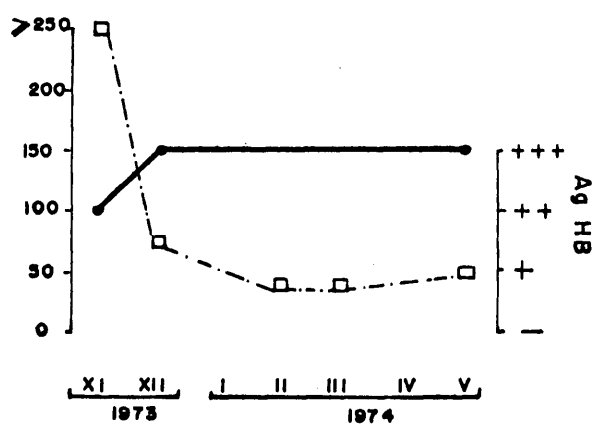
HEPATITIS B



Caso nº 42: J.M.R.R. ♂ 28 años



Caso nº 43: T.N.L.Q. ♀ 19 años



VI-1973; Ag y Ac HB

Caso nº 44: A.D.G. ♀ 23 años

IV-2-2) RELACION ENTRE PRESENCIA DE Ac HB E INFECCION
=====

POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS B.
=====

Diez personas a las que se determinaron Ag y Ac HB y fueron seguidas posteriormente, desarrollaron una hepatitis B con Ag HB positivo.

De ellas ocho pertenecían al grupo de enfermos en programa de diálisis crónicas, otra trabajaba en esa unidad y la décima pertenecía al Servicio de limpieza del Departamento de Bacteriología, pero en los seis meses previos a la enfermedad, había estado limpiando material del Departamento de Inmunología. Todas ellas estaban pues en zonas donde --- existe un alto riesgo de infección por el virus de la hepatitis B. Sin embargo dado que la última está clasificada en una zona de menor riesgo (Departamento de Bacteriología) no la incluimos en el presente estudio estadístico por no ser comparable su grupo con los otros dos.

De las personas en programa de hemodiálisis periódicas, ya vimos que veintiseis habían sido revisadas periódicamente y que si comparamos la frecuencia de aparición de hepatitis B entre los que tienen o no Ac HB, la diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Si englobamos estas personas con las que trabajan en las zonas de alto riesgo tenemos los siguientes resultados:

	Diálisis	Alto riesgo	Total	Hepatitis B.
Negativos	13	10	23	6 (26%)
Ac HB \leq 1/27	9	9	18	3 (16,6%)
Ac HB \geq 1/81	4	11	15	0
Total Positivos	13	20	33	3 (9,1%)

Si comparamos la frecuencia de aparición de hepatitis B de las personas con Ac HB positivos y negativos, - la diferencia entre ambos grupos es estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Si comparamos la frecuencia de aparición de hepatitis B entre las personas con Ac HB a títulos inferiores o iguales a 1/27 y aquellos con títulos superiores o iguales a 1/81, la diferencia es también estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Se puede concluir por tanto que la incidencia de - hepatitis es menor entre aquellas personas que tienen Ac HB, y que si el título de Ac HB es igual o superior a 1/81, la protección parece completa (de hecho ninguna de las personas - con títulos mayores de 1/9 ha padecido la enfermedad.

IV-2-3) ESTUDIO DE LA CLASE DE Ac HB MEDIANTE REDUCCION CON
 =====
 2-M.E.
 =====

Se han probado un total de veintidos sueros, determinando los Ac HB simultáneamente en una muestra sin tratar

y en otra reducida con 2-M.E. y alquilada con yodoacetamida.

Estos sueros se clasificaban así:

- A) - Cuatro personas trabajando en zonas de alto riesgo y - con varias determinaciones positivas de Ac HB a títulos elevados.
- B) - Un familiar de un enfermo Ag HB positivo, con títulos elevados de Ac HB
- C) - Seis sueros pertenecientes a tres enfermos en programa de hemodiálisis con Ac HB positivos.
- D) - Once sueros pertenecientes a seis enfermos con hepatitis aguda tipo B.

De ellos quince sueros han sufrido una caída del título de Ac HB como consecuencia del tratamiento y siete han permanecido con el mismo título:

- A) - De estas cuatro personas tres (dos del Departamento de Inmunología y una de la unidad de diálisis) conservaron el mismo título. En la cuarta (del Departamento de Bacteriología) el título cayó de 1/2187 a 1/729.
- b) - En esta enferma el título no varió.
- C) Caso R-31: Se le practicó una determinación cayendo el título tras el tratamiento del suero de 1/729 a 1/27.

Caso R-2: Se le practicaron tres determinaciones. En las dos primeras (XI-1973 y I-1974) el título no se modificó pero en la última (III-1974) el título bajó de 1/243 a 1/27.

Caso R-9: En las dos determinaciones practicadas el título bajó al reducir el suero.

D) Enfermos con hepatitis agudas tipo B:

Caso 2: Se trató el suero recogido en Junio 1973, cinco meses después de comenzado el cuadro, cuando ya hacía tiempo que había remitido totalmente. El título de Ac HB no se modificó con la reducción.

Caso 4: Suero tomado dos meses después de comenzada la hepatitis. Con la reducción el título de Ac HB cayó de -- 1/27 a 1/3.

Caso 12: Se tomó el primer suero con Ac HB detectables 26-XII-1973. Después del tratamiento el título bajó de - 1/81 a 1/9.

Caso 15: Se tomaron tres sueros (3-XII-1973, 8-II-1974, y 26-VI-1974), bajando todos ellos el título con la reducción.

Caso 30: Se tomaron dos sueros del episodio agudo cayendo en ambas el título con la reducción.

Caso 35: Se tomaron tres sueros (Enero, Febrero y Junio 1974) disminuyendo los títulos en los tres con la reducción..

Estos resultados indican la existencia de Ac HB de la clase IgM en quince de los veintidos sueros analizados.

Este tipo de Ac HB aparece en todos los sueros de enfermos con hepatitis B en fase aguda, y en algunos de los enfermos ya curados o sanos con Ac HB positivos.

IV-2-4) INMUNIDAD CELULAR.

=====

Hemos estudiado la inhibición de la migración de los leucocitos (MIF) con Ag HB purificado en un total de veinticinco sueros pertenecientes a veintidos sujetos.

Se consideró sólo el resultado conseguido con aquella de las dos concentraciones de Ag HB que producía una mayor inhibición de la migración respecto al control. En todos los casos menos en uno, ésto se consiguió con 156 microgramos/ml. de Ag HB purificado. Se consideró el test como positivo cuando existía al menos un 20% de inhibición (índice de migración menor o igual a 0,8).

De los veintidós sujetos, diez eran controles sanos o enfermos con proceso no relacionado con el Ag HB o alteraciones en la inmunidad y doce enfermos con hepatitis aguda tipo B,

En veintitres de las veinticinco determinaciones se practicaron simultáneamente determinaciones de Ag HB por ID y de Ac HB por H.A.P.

Controles.- Tres tenían títulos muy elevados de Ac HB (\gg 1/2187). Los tres tenían Ag HB negativo y dos de ellos (un politransfundido y un miembro del Dpto. de Inmunología), - MIF negativo. El tercero (miembro del Dpto. de Inmunología) tenía MIF positivo en las dos determinaciones practicadas (con

un intervalo de dos meses).

- Cuatro tenían niveles bajos de Ac HB (1/3-1/9). Los cuatro tenían Ag HB negativo y tres tenían MIF positivo.

- Dos eran negativos para Ac HB. De ellos uno tuvo MIF positivo y otro negativo. Este último (un miembro del Departamento de Inmunología), se hizo positivo para Ac HB meses más tarde. Repetido entonces el MIF fue negativo de nuevo.

- En uno no se determinó Ag y Ac HB. Era una mujer de 21 años, con una estenosis mitral, no operada. El MIF fue negativo.

Hepatitis Agudas tipo B.-

Se estudiaron 12 casos. Seis evolucionaron clínicamente hacia la curación con desaparición del Ag HB y seis se transformaron en portadores crónicos del Ag HB (tabla 6)

De los seis casos que curaron se practicaron seis determinaciones, entre las cuatro semanas y los diez meses después de comenzado el cuadro. Cuatro determinaciones fueron positivas y dos negativas. Las dos determinaciones negativas, fueron la más precoz y la más tardía en la evolución de los enfermos (cuatro semanas y diez meses después de iniciado el cuadro respectivamente).

De los seis casos que se transformaron en portadores crónicos se practicaron siete determinaciones. Sólo hubo --

una positiva (caso 22), ocho semanas después de comenzado el cuadro cuando el Ag HB era negativo por ID. Sin embargo, repetida la determinación, tres semanas más tarde al mismo enfermo fué negativa; el Ag HB persistía negativo, pero -- apareció de nuevo positivo al volver la enferma a revisión dos meses más tarde. Los otros cinco casos tuvieron MIF negativo. De los seis casos, cinco fueron biopsiados siendo diagnosticados morfológicamente de: Cuadro residual de hepatitis aguda (caso 22), hepatitis aguda prolongada (ARR, MEM y caso 17) y hepatitis crónica persistente (caso 32.).

En resumen se observa que no existe correlación entre la presencia de Ac HB y la existencia de inmunidad celular (nueve casos con Ac HB tienen MIF negativo y dos casos con MIF positivo tienen determinaciones de Ac HB negativas).

Sí existe en cambio una relación clara entre presencia de inmunidad celular y curación de la hepatitis. Los seis enfermos en los que persiste el Ag HB positivo tienen MIF negativo, mientras cuatro de los seis enfermos que curan tienen MIF positivo. (Comparados estos valores la diferencia es estadísticamente muy significativa ($p < 0,01$)).

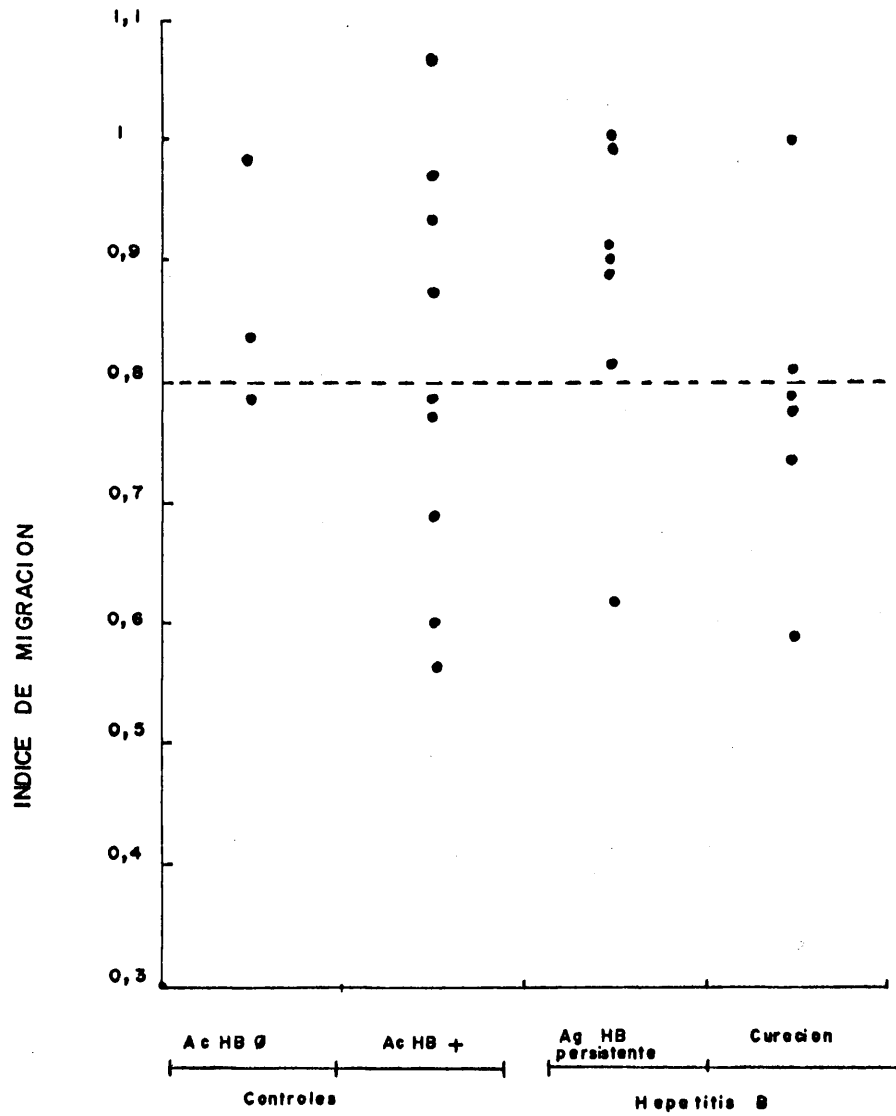
Esta inmunidad celular detectable por la aparición de MIF debe ser transitoria, pues una determinación practicada a los diez meses de la enfermedad fué negativa.

Enfermo	Tº de evolución	Ag HB	Ac HB	MIF
P.M.A.(caso 30)	4 semanas	†	1/243	-
A.B.B.(caso 26)	4 semanas	†	-	†
C.R.G.(caso 20)	7 semanas	-	1/3	†
R.P.B.(caso 21)	7 semanas	-	1/9	†
JP.L.C.(caso 14)	6 meses	-		†
R.D.G.(caso 9)	10 meses	-	1/3	-

Ag HB persistente:

M.P.J.(caso 22)	8 semanas	-	1/9	†
" "	11 semanas	-	1/9	-
M.R.C.(caso 36)	6 meses	†	-	-
J.M.M.R.(caso 17)	7 meses	†	1/9	-
R.M.L. (caso 32)	8 meses	†	-	-
A.R.R.	9 meses	†	1/27	-
M.E.M.	18 meses	†	-	-

Tabla 6: MIF en enfermos con Hepatitis B.



Grafica IV-3 Resultados del test de migracion Leucocitaria
utilizando Ag HB purificado como antipeno

IV-2-5) RESISTENCIA DEL Ag HB AL CALENTAMIENTO

Soulier y cols (1972) y Krugman y cols (1971) han demostrado que calentando suero diluido Ag HB positivo a 60°C durante 10 h. y 98°C durante 1 mn., el Ag HB pierde casi totalmente su infectividad conservando sin embargo su inmunogenicidad. Nosotros hemos tomado alícuotas de una muestra de Ag HB purificado a una concentración de proteína de 56,4 microgramos/ml. en solución salina y los hemos calentado a 80°, 90°, 95°C y ebullición durante una hora, y en autoclave a 1/2 atmósfera durante 20 mn.

No hemos estudiado la infectividad (habría que estudiarla en humanos), pero sí sus caracteres antigénicos. Para ello hemos hecho una prueba de inhibición de la hemaglutinación pasiva, tomando un suero comercial de conejo anti Au/SH. con un título de Ac HB de 1/6.561. A las diluciones de este suero hemos añadido las muestras de Ag HB calentado a diversas temperaturas y sin calentar. Los resultados obtenidos han sido:

Antisuero sin Ag HB: Título 1/6.561.

Antisuero más Ag HB sin calentar: Título 1/27.

" " " calentado 1 h. a 80°C: 1/27.

" " " " " 90°C: 1/81.

" " " " " ebullición: 1/81.

" " " " en autoclave 20 mn.

a 1/2 atmósfera: 1/243.

Observamos que el Ag HB pierde algo de su actividad tras un calentamiento a 90°C durante una hora, y algo -- más tras estar 20 mn. en autoclave a una presión de 1/2 atmósfera (temperatura aproximada 115°C). Sin embargo -- aun en estas condiciones conserva buena parte de su reactividad inmunológica (baja el título de hemaglutinación de 1/6.561 a 1/243.).

Si aceptamos los resultados de Krugman y cols (1971) que demuestran la pérdida de infectividad del Ag HB tras un calentamiento a 98°C (ebullición) durante 1 mn., podemos concluir que la reactividad inmunológica del Ag HB - es mucho más resistente al calentamiento que su capacidad infectante.

IV - 3 - D I S C U S I O N

IV-3-1) TEST DE HEMAGLUTINACION PASIVA
=====

SENSIBILIDAD.

Este test, practicado utilizando hematíes humanos - grupo O, recubiertos por Ag HB de gran pureza obtenido en nuestro laboratorio, tiene una gran sensibilidad.

En todos los sueros se han determinado Ac HB simultáneamente por inmunodifusión (en la misma placa en la que se determinaba Ag HB) y por hemaglutinación pasiva. Con el primero de los métodos se han obtenido muy pocas determinaciones positivas, correspondiendo en su mayoría a títulos de Ac HB por hemaglutinación pasiva entre 1/2187 y 1/59049.

La relación entre los dos métodos sin embargo no ha sido exacta, apareciendo algún suero muy débilmente positivo por inmunodifusión con títulos de hemaglutinación pasiva entre 1/243 y 1/729, y alguno negativo con títulos de hemaglutinación pasiva de 1/2187. Esta discordancia puede explicarse por la mayor sensibilidad del método de hemaglutinación pasiva para detectar anticuerpos de la clase IgM (por el mayor poder aglutinante de éstos), mientras que por precipitación la sensibilidad sería similar para anticuerpos de las diversas clases.

ESPECIFICIDAD.-

La especificidad de la reacción es proporcional a

la pureza del antígeno empleado para recubrir los hematíes. En nuestro caso hemos demostrado la gran pureza del Ag HB utilizado (ver III), por lo que nuestro test es específico para detectar anticuerpos para dicho antígeno. Esta especificidad se ha comprobado en numerosos sueros, añadiendo al suero que contiene Ac HB un exceso de Ag HB antes de añadir los hematíes sensibilizados, con lo que se ha obtenido siempre la negativización de la prueba.

Tampoco se han observado falsos positivos producidos por reacción entre anticuerpos presentes en el suero y antígenos de la membrana del hematíe, que hubieran sido detectados por uno de nuestros controles (hematíes no sensibilizados incubados con el suero problema a la dilución menor empleada 1/3).

HALLAZGO DE Ag HB y Ac HB EN EL MISMO SUERO.-

La presencia en un mismo suero de Ag y Ac HB formando complejos había sido inferida de la actividad anti-complementaria que presentaban algunos sueros de enfermos con hepatitis agudas tipo B (SCHULMAN y BARKER 1969) y observada al microscopio electrónico (ALMEIDA y WATERSON -- 1969, KROHN y cols. 1970).

SHULMAN (1970) fué el primero en encontrar por métodos inmunológicos Ag y Ac HB simultáneamente en tres enfermos (un caso de hepatitis aguda y dos casos de hepatitis crónica agresiva). Hizo la determinación de Ag HB por fijación de complemento y la de Ac HB por hemaglutina

ción pasiva y fijación de complemento. Posteriormente otros autores también han podido detectar la presencia de Ag y Ac HB en un mismo suero (MILLMAN y cols. 1970, por inmunodifusión; PRINCE y BURKE, 1970 y RIGOLI y cols. 1971, por inmunoelectroforesis; y LANDER y cols., 1971, por radioinmunoensayo.).

Nosotros también hemos detectado la presencia simultánea de Ag y Ac HB en numerosos sueros, utilizando la inmunodifusión con el suero sin diluir para el Ag HB y la hemaglutinación pasiva en diluciones sucesivas del suero para los Ac HB.

Si bien es lógica la existencia simultánea de Ag y Ac HB formando complejos, es difícil explicar el que ambos puedan determinarse por separado en una misma muestra. Las dos explicaciones más verosímiles son o bien que los hemates recubiertos de antígeno compiten favorablemente con los complejos antígeno-anticuerpo, para este último (SHULMAN 1970), o bien que la dilución de los sueros favorece la disociación de los complejos (RIGOLI 1971). En cualquier caso, hay que pensar que sólo logramos determinar antígeno y anticuerpos simultáneamente cuando están cerca del punto de equivalencia o cuando existan anticuerpos de baja afinidad, que sean más fáciles de disociar de los complejos.

IV-3-2) SIGNIFICACION DE LOS Ac HB

=====

Ya está claramente demostrado que el Ag HB es un

antígeno viral asociado íntimamente con el agente que transmite la hepatitis tipo B (BLUMBERG y cols. 1970 b).

La presencia en un sujeto de Ac HB indica indudablemente la existencia de un contacto previo con el antígeno, y por tanto con el virus causante de este tipo de hepatitis. Numerosos autores consideran por ello que la presencia de Ac HB indica la existencia de una infección pasada o presente - por el virus de la hepatitis B (HEATHCOTE y cols. 1974). Sin embargo KRUGMAN y cols. (1970 b y 1971) han observado que el calentamiento a 98°C durante un minuto de suero Ag HB positivo destruye su infectividad sin alterar apenas su antigenicidad. Niños a los que se les inocula este Ag HB calentado no tienen evidencia clínica ni bioquímica alguna de hepatitis, apareciendo sin embargo en ellos Ac HB. Posteriormente GAST y cols. (1973) observaron que Ag HB purificado y calentado a 100°C durante 3 minutos es capaz de producir una respuesta de Ac HB en cobayas y de estimular linfocitos humanos previamente sensibilizados para el antígeno, y nosotros hemos observado como Ag HB purificado, mantenido 20 minutos en autoclave a una presión de media atmósfera (temperatura alrededor de 115°C) conserva sus determinantes antigénicos en una prueba de inhibición de la hemaglutinación pasiva. Aunque tanto GAST y cols. como nosotros no hemos probado si el Ag HB calentado conserva su infectividad, hay que deducir - de los estudios de KRUGMAN y cols. que ésta se ha perdido. La resistencia del Ag HB a otros tratamientos físicos y químicos, por lo que respecta a su antigenicidad, también es -

muy grande (ver I.), posiblemente también en estos casos mayor a la de su infectividad. Es posible por tanto que material Ag HB positivo alterado produzca una respuesta inmunológica sin infección por el virus B.

Hemos visto que la mayor parte de las personas con Ac HB detectables por hemaglutinación pasiva no tienen antecedentes de hepatitis. De ellos, muchos habrán tenido contacto con material Ag HB positivo con capacidad infectante, pero probablemente algunos sólo hayan tenido contacto con material que conserve su antigenicidad pero haya perdido su infectividad. Es imposible por tanto saber cuales de estas personas han padecido una hepatitis subclínica y cuales no.

IV-3-3) TRANSMISIBILIDAD DE LA HEPATITIS B: INCIDENCIA DE -
=====

Ag y Ac HB
=====

Cuando se observó que la hepatitis B podía transmitirse por vía no parenteral (KRUGMAN y cols 1967) y que alrededor de un 50% de los enfermos infectados no tenían antecedentes de inoculación por esa vía (PRINCE 1969, COSSART y VAHRMAN 1970) se comprendió el enorme problema epidemiológico que podía suponer el contagio por otras vías de esta enfermedad. Entonces se comenzaron a hacer estudios de poblaciones, para conocer la incidencia del Ag HB y de los Ac HB. Se vió que la incidencia del Ag HB era inferior al 1% en todos los países salvo en algunas zonas tropicales (BLUMBERG

y cols. 1973.). En España, GUARDIA y cols (1970) encontraron 0,3% en enfermos hospitalarios sin hepatopatía, 0,4% en donantes de sangre voluntarios, y SERRANO GONZALEZ-SOLARES (1972) 0,86% en donantes retribuidos.

Las primeras determinaciones de Ac HB fueron realizadas por inmunodifusión e inmunolectroforesis, métodos muy poco sensibles que daban incidencias muy bajas de Ac HB. Así MILNE y cols (1971) encontraron nueve casos con Ac HB entre 19.524 donantes de sangre, BANKE y cols (1971) veintiocho entre 10.000 donantes, WALLACE (1972) ochenta y dos entre 147.636 donaciones y SHWE y ZUCKERMAN (1972) uno entre 60 enfermos de lepra.

En los últimos tres años, diversos autores simultáneamente con nosotros han comenzado a determinar los Ac HB por radioinmunoensayo y hemaglutinación pasiva. La sensibilidad muy superior de estos métodos ha dado lugar al hallazgo de Ac HB con sorprendente frecuencia, descubriendo la gran facilidad de contagio de la hepatitis B e indicando por la distribución de estos Ac HB en qué condiciones es más frecuente este contagio.

CONTROLES SANOS.-

Los diversos estudios realizados muestran frecuencias variables dependiendo probablemente de la población elegida y de la técnica empleada. En efecto, existen diversos métodos inmunológicos con sensibilidades distintas aunque siempre muy grandes, y los tests de hemaglutinación pasiva e

también varían en su sensibilidad según el grado de pureza del Ag HB empleado y el grado de revestimiento de los hemáties. Nuestros porcentajes para Ac HB (24,4%) son de los más altos, sólo superados por la frecuencia encontrada por CHERUBIN y cols. (1972) en Nueva York en individuos de baja clase socioeconómica. (37,4%). Este mismo autor encuentra sólo un 11% en personas de la misma ciudad pero de estrato socioeconómico elevado. PATTSION y cols. (1973) encuentran un 13%, HACKER y AACH (1971) un 10% y SZMUNESS y cols. (1973) un 7,3%.

No existen diferencias en cuanto a sexos, pero tanto CHERUBIN y cols. (1972) como nosotros hemos observado que la incidencia es mayor en las edades medias de la vida que en la juventud.

Estos datos indican la enorme frecuencia de infecciones, la mayoría de las cuales no pueden ser explicadas por una inoculación parenteral. Parece que la transmisión se hace a lo largo de la vida, siendo más fácil en grupos socioeconómicos más inferiores donde el contagio directo de persona a persona es más fácil. Estas infecciones deben ser en su gran mayoría subclínicas, pues estas personas no recuerdan antecedentes de hepatitis. Esto contrasta con las infecciones parenterales en las que WALSH y cols (1970) han podido observar que alrededor de una tercera parte cursan con síntomas.

DONANTES DE SANGRE.-

HACKER y AACH (1973) encontraron una frecuencia de

Ac HB en donantes voluntarios del 21% comparado con el 10% obtenido en el mismo estudio en personas normales. En donantes remunerados la incidencia es aún mayor, observando PRINCE y cols (1971) un 38,5% frente al 4,9% que encuentran en donantes voluntarios. Observamos en estos datos que sólo es posible comparar poblaciones estudiadas con un mismo método y por el mismo grupo, pues la frecuencia entre los diversos autores es muy dispar, indudablemente debido en gran parte al método empleado.

Nosotros que hemos estudiado únicamente donantes remunerados encontramos una alta incidencia (51%) que comparada con la de los controles arroja una diferencia estadísticamente muy significativa.

Estas diferencias entre donantes y controles son muy difíciles de explicar, en especial las de los donantes voluntarios, Probablemente el hecho de haber sufrido más pinchazos y haber frecuentado los bancos de sangre son las únicas explicaciones posibles. En el caso de los donantes retribuidos estudiados por nosotros, la diferencia habría que buscarla especialmente en sus condiciones socioeconómicas, dado que todo el material utilizado en el banco de sangre es deseable.

También se han encontrado diferencias notables en la frecuencia de Ag HB entre donantes voluntarios y retribuidos (0,4% y 1% respectivamente) (GUARDIA y cols 1970) y en la frecuencia de hepatitis producidas por sangre donada por ambos grupos (WALSH y cols. 1970).

PERSONAL TRABAJANDO EN ZONAS DE ALTO RIESGO

Es frecuente la aparición de hepatitis B entre las personas que trabajan en hospitales (8 casos de los 44 estudiados por nosotros). En la mayoría de los casos sin embargo, estas personas no recuerdan heridas o pinchazos que hayan podido suponer una inoculación parenteral. Las cifras obtenidas por nosotros (73,3%) en aquellos que trabajan con material Ag HB positivo dan una idea de la frecuencia de contagio en estas personas. Ellas son además las que tienen títulos más elevados de Ac HB (55% con títulos iguales o superiores a 1/81) que en general no alcanzan aquellas personas que han padecido una hepatitis aguda tipo B. Estos títulos muy probablemente indican un contacto muy estrecho y repetido con el agente productor.

FAMILIARES DE ENFERMOS PORTADORES DE Ag HB

El primer dato digno de resaltarse es la mayor incidencia de varones entre los enfermos con Ag HB persistentemente positivo. En efecto, de los catorce enfermos hay doce varones. Este dato ya ha sido referido por SUTNICK y cols. (1972 a) recogiendo estadísticas de diversos autores, aunque su causa está sin aclarar (REED y cols. 1973).

Entre los treinta y dos familiares estudiados, nosotros hemos encontrado tres casos Ag HB positivo, lo que indica una incidencia muy superior (9,3%) a la de la población normal en nuestro país. Esto ya había sido descrito por ---

otros autores, siendo HADZIYANNIS y MERIKAS en 1970, los primos que encontraron tres miembros de una misma familia con Ag HB positivo. Después otros autores han publicado hallazgos similares (WRIGHT y cols. 1970; SCHWEITZER y SPEARS 1970, BANCROFT y cols. 1971; DENISON y cols. 1971; OHBAYASHI y cols. 1971). FEINMAN y cols. (1973) comprobaron en catorce familiares Ag HB positivo de nueve enfermos crónicamente positivos, que en todos los casos el subtipo del Ag HB era el mismo para todos los miembros de cada familia. Esto ha sido confirmado por BRUGUERA y cols. (1974). Si bien esto venía a apoyar una transmisión del virus probablemente por vía no parenteral entre personas que conviven estrechamente, no daba una idea clara de la frecuencia del contagio, pues otros familiares podían tener el Ag HB negativo en el momento de la determinación, aunque también hubieran tenido contacto con el virus. La determinación simultánea en estas familiares de Ac HB por hemaglutinación pasiva, podía darnos una idea mucho más exacta de la frecuencia de este contacto. Los resultados indican una gran diseminación del virus en estas personas, pues veintitres tienen Ac HB detectables en el suero. En total veintiseis de treinta y dos (81,2%) familiares al menos muestran haber tenido un contacto previo con el virus (reflejado por la presencia del Ag o Ac HB en su suero.). Esta incidencia alcanza al 100% tanto en esposos como en hermanos y primos que conviven en una misma casa, lo que parece demostrar que la facilidad de contagio aumenta al aumentar el contacto físico, y que la transmisión venérea, si bien po

sible, no es necesaria, no debiendo jugar un papel tan importante como suponen algunos autores (FULFORD y cols.1973). IRWIN y cols. (1974) y HEATHCOTE y cols (1974 b) han encontrado resultados semejantes a los nuestros aunque menos significativos.

ENFERMOS.-

Nos interesaban dos grupos de enfermos. Por un lado los pertenecientes al programa de hemodiálisis periódicas y por otro aquellos que tienen hepatopatías crónicas. Dado que éstos son enfermos que están sometidos a análisis repetidos y estancias frecuentes en hospitales, estudiamos también enfermos en las mismas condiciones, pero sin enfermedad hepática, que nos pudieran servir para establecer comparaciones.

Enfermos en programa de diálisis.-

Las hepatitis víricas son un problema grave y frecuente en las unidades de diálisis. Así en un estudio realizado en los Estados Unidos en 120 unidades (U.S.N.C.D.C. -- 1969) se observó cómo el 10% de 1.008 pacientes y el 3% de 1.070 miembros del personal tuvieron hepatitis en el periodo estudiado, y en Europa una de los últimos estudios realizados por la Asociación Europea de Diálisis y Transplantes reveló que el 47% de los centros tuvieron algún caso en el año 1971, existiendo más de 10 casos en el 10%; la frecuen

cia en los enfermos es del 7% y entre el personal sanitario se calcula que debe oscilar también entre el 5 y el 10% (-BRUNNER y cols. 1972; MARMION y TONKIN 1972). Se ha comprobado que la mayor parte de estos brotes son Ag HB positivo (POLAKOF y cols. 1972).

Cuando nosotros iniciamos el estudio de los enfermos y personal sanitario de la unidad de diálisis de la Fundación Jiménez Díaz, en Junio de 1973, acababa de aparecer un caso de hepatitis B en una de las enfermeras. En ese momento era la única persona con Ag HB en la unidad, y no habían existido tampoco otros casos en los meses anteriores. Sin embargo el 50% de los veintidos enfermos y el 66,6% de los doce miembros del personal sanitario estudiado tenían Ac HB.

Durante las revisiones periódicas realizadas hasta Julio de 1974 (14 meses de estudio) se descubrió el Ag HB en trece personas (once enfermos y dos miembros del personal sanitario) y otros tres (dos enfermos y un miembro del personal sanitario) se hicieron Ac HB positivo, después de haber sido negativos. Ninguno de estos tres casos tuvieron síntomas, pero a los dos enfermos a los que se determinó la TGO, la tuvieron discretamente elevada (120 y 130mU). Al final del estudio de los veintidos enfermos seguidos más de seis meses, el 36,4% tenían Ag HB y el 54,6% tenían o habían tenido Ac HB.

En una revisión de quince unidades de hemodiálisis

sis norteamericanas , SZMUNESS y cols. (1974) también encuentran incidencias elevadas de Ag y Ac HB en enfermos y personal sanitario.

De estos estudios se deduce el gran riesgo de contagio por el virus de la hepatitis B que presentan tanto los enfermos como las personas que trabajan en la unidad, y la facilidad con que se propaga una epidemia por dicho virus pese a las numerosas precauciones que se tomaron (aislamiento de los casos positivos que son dializados en días diferentes y en la medida de lo posible en zonas diferentes de la unidad, material desechable, utilización de guantes, etc..).

Otro aspecto interesante era comprobar si los enfermos con insuficiencia renal terminal eran capaces de producir Ac HB. Es sabido que estos enfermos tienen diversas anormalidades inmunológicas. La inmunidad celular está muy afectada, como se observa por el retraso en el rechazo de homoinjertos (DAMMIN y cols. 1957), la falta de reactividad en las pruebas cutáneas (WILSON y cols. 1965) y la falta de respuesta de los linfocitos a la fitohemaglutinina (NEWBERRY y SANFORD 1971), y a diversos antígenos virales y no virales (SANDERS y cols. 1971). La afectación de la inmunidad humoral es menos completa, habiéndose observado respuestas normales de anticuerpos frente al toxoide de la difteria (STOLOFF 1958) y el virus de la gripe (JORDAN y cols. 1973) y disminuídas para los antígenos O y H de la vacuna tífica (WILSON y cols. 1965). La gran frecuencia de

Ac HB y el que hayan aparecido estos anticuerpos en todos los enfermos estudiados por nosotros que tuvieron Ag HB, - indican que la respuesta humoral al Ag HB está conservada en estos enfermos.

Enfermos hepáticos crónicos

La etiología de las enfermedades hepáticas crónicas es en general oscura. Desde hace muchos años se han incriminado numerosos factores (etilismo, virus, fenómenos autoinmunes, etc..) sin que realmente se sepa hasta qué punto son responsables de la aparición y la progresión de estos procesos.

El descubrimiento del Ag HB como marcador del virus de la hepatitis B ha permitido valorar su importancia en estos cuadros. En las determinaciones realizadas, la frecuencia de Ag HB ha variado según los autores y los países, entre 51% en Italia (BIANCHI y cols. 1972) y 6% en los Estados Unidos (KAPLAN y GRADY 1971) con una media de casi 20% (SUTNICK y cols. 1972). En España BRUGUERA y cols. (1972) encontraron un caso Ag HB positivo entre cincuenta y un enfermos con cirrosis alcohólica (2%) y cuatro entre treinta y ocho enfermos con cirrosis criptogenética (10,5%). Sólo encontraron un enfermo con Ac HB. La baja incidencia de Ac HB es debida a que emplearon un método muy poco sensible (inmunodifusión). Estos datos indicaban que al menos una parte de estos procesos debían estar relacionados con el virus de la hepatitis B.

Nosotros, al determinar simultáneamente Ag y Ac HB, observamos que la frecuencia de ambos en enfermos con procesos hepáticos era significativamente mayor que en sujetos normales, y también que en otros enfermos con edades e historia de ingresos hospitalarios similares. Sin embargo, si excluimos los diez casos (13,8%) Ag HB positivo, la diferencia deja de ser significativa, indicando que debe ser en ellos únicamente donde el virus HB juega algún papel.

No está aclarado el porqué los alcohólicos tienen con frecuencia hepatopatías crónicas. Incluso en los más severos, la incidencia de cirrosis es de uno de cada doce (SHERLOCK 1971) por lo que no parece que el alcohol sea únicamente el responsable. PETTIGREW y cols. (1972) estudiaron once enfermos con hepatopatía crónica alcohólica y encontraron en todos los casos una transformación blástica de los linfocitos tras la estimulación con suero rico en Ag HB. Esto les llevó a sugerir que el virus de la hepatitis B juega un papel en el desencadenamiento de estos procesos, probablemente produciendo una hepatitis que en los alcohólicos no curaría. Estos resultados sin embargo no han sido confirmados y GABER y cols. (1972) estudiando también la inmunidad celular frente al Ag HB en estos enfermos, no encontraron ningún caso positivo. Ellos emplearon el test de la migración leucocitaria y como antígeno también suero rico en Ag HB.

Los resultados de BRUGUERA y cols. (1972) y los -
nuestros están de acuerdo con estos últimos autores, ---
pues no hemos encontrado una incidencia significativamen
te mayor de Ag HB y/o Ac HB en los enfermos hepáticos --
con antecedentes etílicos que en enfermos no hepáticos.
Pensamos pues que estos enfermos no han tenido una fre--
cuencia mayor de exposición al virus de la hepatitis B y
por tanto que éste no debe jugar ningún papel en la enfer
medad de estos pacientes.

IV-3-4) CLASE DE INMUNOGLOBULINAS A LA QUE PERTENECEN LOS
===== Ac HB
=====

LANDER y cols. (1971) con un método de radioinmuno
precipitación, encontraron anticuerpos IgG e IgM pero no
IgA. En una respuesta primaria obtenida inoculando a ni--
ños subnormales con Ag HB, obtuvieron sólo anticuerpos --
IgG. Después de una segunda inoculación, la respuesta fué
en dos casos de IgG sola y en otros dos de IgG más IgM.
Por el contrario, un año más tarde y utilizando la misma
técnica, LANDER y cols. (1972), encontraron en diez adul
tos con una respuesta primaria IgG e IgM. Ambos aparecie
ron simultáneamente en siete enfermos; la IgM apareció --
primero en otros dos y en el décimo fué la IgG la que se
detectó antes. En cinco de ellos persistían ambas al fi--
nal del estudio, en otros cuatro había desaparecido la --

IgM y en el último desaparecieron ambas al cabo de pocas -
semanas. Estos autores piensan que la diferencia que encon-
traron entre niños y adultos puede deberse o bien a una --
respuesta inmunológica diferente entre ambos o bien a un -
enmascaramiento en los niños de los anticuerpos IgM en la
respuesta primaria debido a la presencia de títulos eleva-
dos de IgG.

Nosotros hemos tratado de determinar la clase
de inmunoglobulina por un método indirecto viendo si la ca-
pacidad de aglutinar hemafíes recubiertos de Ag HB persis-
tía tras una reducción que transformara los pentámeros de
IgM en monómeros. De los veintidos sueros probados, en ---
quince cayó el título de Ac HB por H.A.P., indicando que -
existían anticuerpos IgM. De ellos, ocho eran de personas
con una respuesta primaria y siete de personas que lleva--
ban mucho tiempo con Ac HB positivos.

Los siete sueros en los que no varió el títu-
lo, pertenecían a personas que llevaban tiempo con Ac HB.

En todos los sueros después de la reducción
con 2-M.E., quedaba alguna capacidad aglutinante. En los -
casos en que la caída del título fué muy grande, no se pue-
de descartar que la actividad residual corresponda a un --
resto de IgM sin reducir, aunque es más probable que la --
aglutinación producida por el suero reducido sea debida en
todos los casos a IgG.

En resumen, en una respuesta primaria parecen existir simultáneamente anticuerpos IgG e IgM. Posteriormente en algunos casos persisten ambas y en otros solo la IgG.

En enfermos con hepatitis agudas, en los que no se han podido hacer determinaciones precoces de Ag HB, se plantea con frecuencia la duda de si la hepatitis es del tipo B. La determinación de Ac HB sirve en ocasiones para aclararlo, si tras ser negativos en un principio, aparecen en título creciente en el periodo de convalecencia.

Sin embargo, si las determinaciones se hacen algo más tarde cuando ya han aparecido los Ac HB, y su título no se modifica, el estudio de la clase de inmunoglobina de que se trata no sirve para asegurar que la hepatitis sea del tipo B, dado que los anticuerpos IgM existen tanto en la respuesta primaria, como en personas que tienen Ac HB desde hace tiempo. Sólo si no existen Ac HB de la clase IgM se pueden asegurar que no se trata de una respuesta primaria y por tanto que la hepatitis no ha debido ser producida por el virus B.

IV-3-5) PAPEL DE LOS MECANISMOS INMUNOLOGICOS EN LA PROTECCION FRENTE A LA HEPATITIS B.

Los anticuerpos circulantes son considerados como uno de los mecanismos de defensa más importantes frente a las infecciones por virus. En los enterovirus se ha observa

do cómo estos anticuerpos evitan la diseminación del virus desde el lugar de la infección primaria a los órganos más susceptibles (como el corazón y el cerebro).

Así los niños con hipogammaglobulinemia muy marcada pero inmunidad celular conservada son mejores candidatos - para desarrollar poliomielitis con parálisis extensas que los niños normales (Allison 1974).

Sin embargo en algunos casos los anticuerpos reducen la infectividad del virus pero no logran destruirla por completo. Se cree que ésto ocurre cuando los anticuerpos se unen a partes del virus no necesarias para iniciar la infección, evitando la unión de otras moléculas de anticuerpo en las zonas importantes. Estos complejos antígeno-anticuerpo son responsables entonces de la cronificación de la infección (Allison 1974).

La inmunidad celular también juega un papel importante en la protección frente a algunos virus. Así enfermos -- con inmunidad humoral conservada, pero con alteraciones en la inmunidad celular, tienen frecuentes infecciones por virus del herpes simple, varicela, sarampión y citomegalovirus (Cooper y cols. 1968, Lux y cols. 1970, Miller 1968).

Esta diferente susceptibilidad de los virus a los diferentes mecanismos inmunológicos puede explicarse por su forma de diseminación.

Existen tres formas principales:

- Extracelular: Aquellos virus que se multiplican en una célula pasando luego a los líquidos extracelulares -- (sangre, linfa, líquido cefalorraquídeo, etc..) hasta llegar a sitios distantes. Estos son los que pueden ser neutralizados por los anticuerpos.

- Célula-célula: Algunos virus como el del herpes simple, pueden pasar a través de puentes entracelulares evitando así a los anticuerpos que son incapaces de penetrar las células (Lodmell y cols. 1973). Otros como el del sarampión pueden formar sincitios que faciliten su diseminación.

La protección frente a estos virus viene dada por la inmunidad celular, pudiendo ser bloqueada por ciertos factores (antígeno y complejos antígeno-anticuerpo). (Sjögren y cols. 1971).

- Nuclear: En la división celular la información genética del virus puede pasar a las células hijas. La presencia de DNA polimerasa en los virus RNA facilita este proceso. Los mecanismos inmunológicos sólo pueden atacar a estos virus si las células infectadas poseen anticuerpos virales en su membrana.

En las hepatitis víricas, la imposibilidad de cultivar los virus responsables, ha impedido conocer su mecanismo de propagación y obtener vacunas que permitieran valorar el papel protector de los diferentes mecanismos inmunológicos. Sin embargo, se sabe que después de haber padecido una hepatitis viral queda una protección al menos parcial fren-

te al virus responsable (Krugman y Giles 1970).

Tanto Holland y cols (1966) como un estudio cooperativo muy amplio realizado en Estados Unidos (Grady y Benner 1970), han demostrado que la gamma globulina convencional no es útil para prevenir o atenuar la hepatitis B, aunque está bien probada su utilidad frente a la hepatitis A ---- (Krugman y Giles 1970).

El desarrollo de los métodos de determinación de Ac HB ha hecho posible el seleccionar gamma globulina específica y estudiar su influencia en el curso de las hepatitis agudas tipo B. Tanto Soulier y cols. (1972) como Krugman y cols (Krugman y cols. 1971,b, Krugman y Giles 1973), han observado que la inyección de esta gamma globulina con títulos muy elevados de Ac HB, poco después de la inoculación del Ag HB atenúa la hepatitis producida.

Este tipo de inmunización sin embargo no está exenta de posibles riesgos. En efecto, se sabe que la administración exógena de anticuerpos puede deprimir la respuesta del sujeto, y esto es utilizado en clínica humana para evitar la isoimmunización materna en casos de incompatibilidad Rh entre la madre y el feto. Cabe la posibilidad que también en el caso de la hepatitis B la inmunización pasiva -- evite la respuesta del individuo, que entonces no sería capaz de eliminar el Ag HB y se transformaría en un portador crónico, con el riesgo de que su lesión hepática se cronifique (Prince y cols. 1971, Alter y cols. 1972).

A favor de ello está el que la mayor parte de las -

hepatopatías crónicas Ag HB positivo comienzan sin cuadro florido de hepatitis aguda (Sherlock y cols. 1970).

Actualmente están en marcha tanto en Inglaterra - (Kerr 1973) como en Estados Unidos (Chalmers 1973) amplios protocolos sobre el papel de la inmunización pasiva en la hepatitis B, que es de esperar que aclaren pronto el problema.

Además de los trabajos realizados sobre inmunización pasiva mediante la inyección de gamma globulina rica en Ac HB, existen otros sobre inmunización activa, mediante la inoculación de suero Ag HB positivo calentado. Estas pruebas han sido realizadas por Krugman y cols. (Krugman y cols. 1971 a, Krugman y Giles 1973). En total han tratado veintinueve niños subnormales con una, dos o tres inyecciones de suero Ag HB positivo calentado durante 1 mn. a 98°C. Entre cuatro y ocho meses después les inyectaron el suero sin calentar, En total la inmunización fué efectiva para evitar o atenuar la hepatitis en veinte (69%) de los veintinueve niños. También obtuvieron una menor incidencia de portadores crónicos, comparado con la obtenido inyectando el suero Ag HB positivo sin calentar en niños sin inmunización previa. Los resultados fueron similares después de una, dos ó tres inoculaciones del suero calentado. Esto viene a demostrar que la inmunización protege frente a la hepatitis B, pero no indica si esta defensa viene dada por los Ac HB o por la aparición de una inmunidad celular.

Aunque Krugman y cols. (1970) no encontraron signos

de hepatitis (elevación de la TGO o/y aparición del Ag HB en sangre) en los niños inyectados con el Ag HB calentado, la obtención de una vacuna que pueda ser autorizada necesitará del cultivo del virus o de una gran purificación de los determinantes antigénicos, con pruebas bien controladas que demuestren la inocuidad de la vacuna.

Por tanto el conseguirla tardará algunos años. La protección hoy por hoy sólo puede venir de inoculaciones accidentales, causantes o no de hepatitis. La gran transmisibilidad del virus hacen sin embargo que estos contactos accidentales sean frecuentes y que de hecho posiblemente una parte importante de la población esté ya protegida contra la infección.

Dado que poseemos técnicas capaces de detectar la existencia de inmunidad humoral y celular contra el Ag HB, tiene gran importancia saber si las personas que poseen uno u otro tipo de inmunidad están protegidas contra la infección.

Nosotros hemos tenido la oportunidad de seguir una epidemia de hepatitis B en la unidad de diálisis de la F.J.D., apareciendo la enfermedad en sujetos a los que previamente se les habían determinado Ac HB. Los resultados obtenidos permiten afirmar que existe una relación estrecha entre presencia y título de Ac HB y protección frente a la enfermedad. Esto ha sido confirmado por Prince y cols. (1974).

La protección sólo es total en aquellos enfermos -- que tienen títulos altos de Ac HB. Dado que tras una hepatitis B, los Ac HB pueden quedar a títulos muy bajos e incluso llegar a desaparecer al cabo de algún tiempo, (como hemos observado tanto nosotros como Lander y cols. 1972), existe entonces la posibilidad de una reinfección por el mismo virus.

Nuestras observaciones de la falta de correlación entre inmunidad humoral y celular frente al Ag HB, encontrando casos con títulos elevados de Ac HB que no poseen inmunidad celular contra el antígeno, hacen pensar que la presencia de Ac HB, sin el concurso de mecanismos celulares - deben ser suficientes para evitar la hepatitis B, probablemente impidiendo la llegada del virus desde el lugar de entrada hasta el hígado. Esto apoyaría la utilidad de la - inmunización pasiva con gamma globulina, conteniendo títulos altos de Ac HB, siempre y cuando esta inmunización se haga previa a la llegada del virus al hígado. Si la inyección se hiciera demasiado tarde es muy probable que los Ac HB ya no sean capaces de actuar sobre el virus introducido en los hepatocitos, y que pueda sin embargo actuar inhibiendo la puesta en marcha de otros mecanismos inmunológicos con el riesgo de cronificar la enfermedad.

Que la inmunidad humoral tenga un papel protector -- frente a la hepatitis B, no excluye que la inmunidad celular puede actuar en el mismo sentido. Este aspecto está todavía sin estudiar. Reed y cols. (1974) han encontrado una

frecuencia de MIF positivo en sujetos controles del 30%, - frente al 86% en los miembros de un departamento de Inmunología, pero no han comprobado si existe diferencia en la - aparición de hepatitis entre las personas positivas y negativas.

IV-3-6) PAPEL DE LOS MECANISMOS INMUNOLOGICOS EN LA

=====

EVOLUCION DE LA HEPATITIS B

=====

En las enfermedades a virus por lo general son -- éstos directamente los que producen las lesiones celulares, correspondiendo a los mecanismos inmunológicos el facilitar la curación. Sin embargo, con frecuencia estos mismos mecanismos contribuyen también en mayor o menor medida a - producir las lesiones. Incluso en algunas infecciones virales como la coriomeningitis linfocitaria (Doherty y Zinkernagel 1974), el propio virus no produce daño alguno, siendo la respuesta inmunológica la que produce la enfermedad y puede conducir a la muerte del animal infectado.

Esta función de la respuesta inmune viene dada por la posibilidad de que antígenos virales se incorporen a la membrana de las células, haciéndolas blanco de la respuesta frente a dichos antígenos o porque los virus al salir de la célula incorporen componentes celulares que puedan - entonces hacerse inmunogénicos por su asociación a componentes virales (Javitt y cols. 1973). La respuesta inmuno-

lógica puede producir lesiones en las infecciones virales por diversos mecanismos:

a) Mediados por la unión de anticuerpos y complemento a las células infectadas. Se ha visto "in vitro" cómo la infección de células por virus (rabia, herpes simple, varicela, influenza, etc..) produce nuevos antígenos en la superficie de estas células y que al añadir anticuerpos específicos contra el virus, más complemento se produce daño celular (Wiktor y cols. 1968, Brier y cols. 1971).

b) Mediados por células inmunocompetentes: El ejemplo de este tipo de lesiones viene dado por las producidas en la coriomeningitis linfocitaria. Cole y cols. (1972, 1973) han demostrado "in vivo" la necesidad de la presencia de los linfocitos T para la aparición del cuadro típico y confirmado "in vitro" el efecto citopático de los linfocitos sensibilizados sobre células portadoras de los antígenos virales. Este tipo de lesiones puede ser evitado por factores bloqueantes (anticuerpos o complejos antígeno-anticuerpo).

c) Mediados por complejos antígeno-anticuerpo: Producen síntomas de enfermedad del suero (artralgias, artritis, rash cutáneo, vasculitis y glomerulonefritis). En ratones infectados por algunos virus (el de la coriomeningitis linfocitaria entre otros) se producen glomerulonefritis con presencia de complejos virus-anticuerpos en la circulación y depósito de estos complejos más complemento en las paredes de los capilares glomerulares y en el mesangio, como se obser-

va por inmunofluorescencia (Oldstone y Dixon 1969,1971).

d) Mediados por células citotóxicas para células recubiertas de anticuerpo: Este mecanismo mediado por células T (linfocitos B o macrófagos) es aún mal conocido y no se ha demostrado todavía que intervenga en la patogenia de -- las enfermedades virales.

En las hepatitis víricas tipo B, parece probable -- que los mecanismos inmunológicos tengan la doble función - de curar la enfermedad y de producir las lesiones. Su pa-- pel beneficioso está apoyado por dos hechos principales:

- Se observa que aquellos enfermos que curan, desarrollan una respuesta inmunológica tanto celular como humoral frente al Ag HB y que la primera es ya detectable cuando - empieza a mejorar el proceso.

- Aquellos enfermos que tienen déficits inmunitarios tanto por enfermedad previa (Hodgkin, insuficiencia renal crónica) como por tratamientos inmunosupresores (enfermos con transplantes renales) tienen una gran tendencia a la - persistencia del Ag HB y a la cronificación de la hepatitis.

Su papel patógeno también está apoyado por numero-- sas observaciones:

- Existen personas con Ag HB tanto en sangre como en el interior de los hepatocitos que sin embargo no tienen - evidencia clínica, bioquímica ni morfológica de lesión hepática. Esto indica que el virus de la hepatitis B no debe de ser patógeno por sí mismo.

- La sangre de esas personas es sin embargo capaz de producir hepatitis aguda al ser transfundida a otras personas.

- No existe relación entre el subtipo de Ag HB y la aparición o no de hepatitis B.

- No existe relación entre la cantidad de Ag HB presente en el suero y la gravedad de la lesión hepática.

- La existencia de lesión hepática es significativamente más frecuente entre los portadores crónicos de Ag HB con Ac HB que entre los que no los tienen.

- La hepatitis aguda tiene un cuadro mucho más benigno en aquellos enfermos con déficits inmunitarios (dializados, transplantados) que en aquellos que tienen una inmunidad conservada.

- Con frecuencia en la hepatitis aguda aparecen sínto más de enfermedad del suero (rash cutáneo, artralgias).

- MECANISMOS INMUNOLOGICOS QUE FACILITAN LA CURACION DE LA ENFERMEDAD.

La curación de la hepatitis y la desaparición de Ag HB va unida en la mayoría de los casos a la aparición de Ac HB detectables por H.A.P. y de inmunidad celular frente al Ag HB detectable por la inhibición de la migración de los leucocitos.

Los Ac HB aparecen bien desde el comienzo del proceso (casos en los que hay que pensar que se trata de una -- respuesta secundaria) bien cuando ya ha desaparecido el Ag HB o está a punto de desaparecer y cuando ya la ictericia

y la elevación de las transaminasas han desaparecido casi totalmente. En ambos grupos de enfermos la evolución clínica y bioquímica es muy similar no suponiendo la presencia de anticuerpos una curación más rápida. Por otro lado en todos aquellos casos que se han cronificado y en los que persiste el Ag HB hemos observado también la aparición de Ac HB, incluso con frecuencia a títulos más elevados que en los que tienen una evolución hacia la curación. Se puede concluir por tanto, que los Ac HB no facilitan la desaparición del Ag HB ni la curación de la lesión hepática.

Por el contrario, sólo hemos observado la aparición de una respuesta celular frente al Ag HB en aquellos enfermos que evolucionan hacia la curación.

Dudley y cols. (1972) utilizando Ag HB sin purificar, también obtuvieron una mayor inhibición de la migración en las hepatitis agudas que en los portadores crónicos, y Reed y cols. (1974) encontraron inmunidad celular frente al Ag HB en los seis enfermos estudiados convalecientes de una hepatitis aguda.

Estos resultados parecen indicar que la curación de las hepatitis agudas tipo B depende de la aparición de una inmunidad celular frente al Ag HB.

- MECANISMOS INMUNOPATOLOGICOS EN LAS HEPATITIS B:

En la hepatitis B existen manifestaciones hepáticas y extrahepáticas. Estas últimas son muy semejantes a -

las producidas en la enfermedad del suero, por lo que se piensa que sean producidas por complejos antígeno-anticuerpo HB (Alpert y cols. 1971).

De hecho ya se ha observado la presencia de Ag HB al menos en trece enfermos con periarteritis nodosa, encontrándose en dos de ellos depósitos de IgM, Ag HB y complemento en las paredes vasculares (Gocke y cols. 1971, Treppe y cols. 1972) y un caso de glomerulonefritis con depósito de Ag HB, IgG y complemento en los glomerulos (Combes y cols. 1971). Nowoslawski (1974) en la autopsia de enfermos fallecidos por hepatitis aguda también ha encontrado Ag HB, IgG, IgM y complemento en la íntima de las arteriolas con lesiones típicas de periarteritis y en los capilares glomerulares.

Mucho más discutible es la patogenia de la lesión hepática. Almeida y Waterson (1969) al encontrar por microscopía electrónica inmunocomplejos HB en un enfermo con hepatitis aguda y otro con H.C.A. mientras solo existía Ag HB en un portador asintomático, pensaron que la lesión hepática debía de estar producida por estos inmunocomplejos. Otros defensores de esta teoría son Nowoslawsky y cols. (1971 a,b) que han comprobado que estos inmunocomplejos HB pueden producir inflamación y que por inmunofluorescencia observan depósitos de Ag HB, IgG, IgM y beta 1C-globulina en el citoplasma, membrana plasmática y núcleo de los hepatocitos de los enfermos con Ag HB. La IgG disociada

de estos complejos por tratamiento con tiocianato potásico tiene además actividad de Ac HB. Resultados similares han sido hallados por Kater y cols. (1974).

Para otros autores los resultados no son tan -- claros y así Edgington y Ritt (1971) solo encuentran por - inmunofluorescencia Ag HB, inmunoglobulinas y complemento en el hígado en el citoplasma de las células del endotelio sinusoidal y de las células de Kupffer y muy ocasionalmen- te en algunos hepatocitos. En el resto solo aparece Ag HB y en el nucleolo Clq.

Prince y Trepo (1971) en un estudio amplio de - enfermos con Ag HB no vieron relación entre la existencia de inmunocomplejos en sangre y el grado de lesión hepática.

Nosotros si hemos observado una correlación entre presencia de Ac HB y lesión hepática en los portadores crónicos de Ag HB y en la comparación de éstos con los enfermos con hepatopatías crónicas Ag HB positivos. Sin embargo, ésto no indica que la lesión sea producida necesariamente por inmunocomplejos y de hecho algunos enfermos con transaminasas elevadas tienen Ag HB pero no anticuerpos. Además en las hepatitis agudas que hemos observado los Ac HB aparecen en algunos casos al comienzo del proceso, y en otros -- cuando ya ha pasado la fase aguda sin que la presencia o el título de los Ac HB se correlacione con la gravedad del cuadro.

El cuadro morfológico tampoco apoya el que la enfermedad esté producida por inmunocomplejos, pues en estos -

casos el infiltrado inflamatorio es de polinucleares y sin embargo, es típico de las hepatitis tanto agudas como crónicas que el infiltrado inflamatorio esté constituido por células mononucleares.

Finalmente hemos visto que la gravedad del episodio agudo es muy diferente en los enfermos con insuficiencia renal crónica, y sin embargo estos enfermos tienen una buena respuesta de Ac HB, estando sin embargo afectada su respuesta celular. También se han visto hepatitis tanto agudas como crónicas en enfermos con agammaglobulinemia. - (Gatti y Good 1970).

Edgington y Ritt (1971) en su estudio con inmunofluorescencia observaron Ag HB en el citoplasma del hepatocito, en la proximidad de la membrana celular, indicando que esto podía dar lugar a que la respuesta inmunológica del huésped se dirigiera contra las células infectadas. -- Esta respuesta que lesionara las células infectadas podía ser mediada con anticuerpos y complemento o por células -- (linfocitos).

Gran parte de los argumentos que hacen poco probable que la lesión hepática esté mediada por inmunocomplejos, van también en contra de que sean los anticuerpos más complemento, los que la produzcan (falta de relación entre presencia de anticuerpos y gravedad de la lesión, infiltrado predominantemente linfocitario etc..) y sin embargo apoyan el que esté mediada por una respuesta inmunológica tipo IV según la clasificación de Gell y Coombs.

Dudley y cols (1972 a,b) son los mayores defensores de esta teoría que va teniendo cada día más partidarios. - Opinan que las células infectadas incorporan a su membrana antígenos virales (el Ag HB). Al desarrollarse una inmunidad celular contra ese antígeno en el huésped, los linfocitos T destruyen las células infectadas siendo los responsables de la lesión hepática pero también de la eliminación total del Ag HB y por tanto de la curación del proceso. -- Sin embargo cuando la función de los linfocitos T, está -- parcialmente alterada entonces la respuesta no será suficiente para eliminar todas las células infectadas, persistiendo el Ag HB y cronificándose la enfermedad que será -- más o menos grave (HCA o HCP) según sea mayor o menor la capacidad de respuesta de los linfocitos T frente al Ag HB. Si la inmunidad celular frente al Ag HB está totalmente ^{de}primida, entonces el huésped será un portavoz crónico del antígeno, pero sin lesión hepática alguna.

Esto está de acuerdo con nuestras observaciones de que los enfermos en programa de diálisis que tienen alterada su inmunidad celular, tienen un episodio agudo mucho -- más benigno, pero luego no acaban por curar de su hepatitis.

Si la lesión está producida por la respuesta celular, sorprende que los seis enfermos crónicos en los que -- nosotros la hemos estudiado no tengan inhibición de la migración de los leucocitos al incubarlos en presencia de Ag HB.

Pero hay que tener en cuenta que todos tenían una lesión hepática poco intensa como se observó por biopsia, y que puede que nuestro método de determinación del MIF no sea capaz de poner de manifiesto pequeñas respuestas celulares.

Dudley y cols. (1972 b) sí han conseguido observar también con la prueba de migración leucocitaria que en las hepatitis agudas todos menos uno de sus enfermos tenían un test positivo, en las hepatitis crónicas agresivas un 50%, alguno aislado en las hepatitis crónicas persistentes y ninguno en los portadores sanos. La crítica a este trabajo viene de que no han empleado Ag HB purificado y esto puede dar lugar a resultados inexactos (Frei y cols. 1973).

IV-3-7) ANTICUERPOS CONTRA EL NUCLEO CENTRAL DE LA PARTICU

LA DE DANE. ("ANTI-CORE ANTIBODIES")

Almeida y cols. (1971 a) utilizando el microscopio electrónico fueron los primeros en observar un segundo sistema antígeno-anticuerpo en los enfermos con hepatitis B. El antígeno es el núcleo central de la partícula de Dane - (que se piensa representa la nucleocápside del virus de la hepatitis B, mientras que el Ag HB no sería más que proteína de recubrimiento).

Barker y cols. (1973) y Brzosko y cols. (1973) también han comprobado la existencia de este segundo sistema antígeno-anticuerpos en las hepatitis B, por inmunofluores

cencia, al encontrar dos patrones de tinción. en los hepatocitos, uno citoplásmico (Antígeno HB) y otro nuclear -- ("anti-core").

Aunque nosotros no hemos llegado a purificar los núcleos de la partícula de Dane, y por tanto no hemos estudiado este sistema antígeno-anticuerpo, nos parece importante comentar brevemente los hallazgos de Hoofnagle y cols. (1973) que han estudiado la presencia de anticuerpos "anti-core", por fijación de complemento en diversos grupos de enfermos.

Estos autores encuentran anticuerpos anti "core - antigen" en todos los enfermos con hepatitis B poco después de aparecer el Ag HB positivo, hasta algún tiempo después de negativizarse éste y en todos los portadores crónicos de Ag HB. No aparece en cambio al reinocularse el Ag HB aquellas personas que han tenido una hepatitis B previa, y que tienen una respuesta secundaria de Ac HB sin infección hepática ni aparición del Ag HB en sangre.

De estos resultados se deducen que el anticuerpo "anti-core" es producido como respuesta a una replicación activa del virus en el hígado. No existe sin embargo ninguna relación entre estos anticuerpos y la presencia de hepatitis, teniéndolos todos los portadores del Ag HB a pesar de que existen como sabemos muchos que no presentan ningún daño hepático.

De todo ello se puede concluir que los anticuerpos "anti-core" pueden ser muy útiles para detectar aquellas personas que están o han estado recientemente infectadas por el virus de la hepatitis B, incluso cuando el Ag HB no es detectable por los métodos habitualmente utilizados -- (Brzosko y cols. 1974).

Sin embargo, al observarse que no existe relación entre estos anticuerpos anti-core y la presencia de hepatitis, sigue siendo válida la teoría de que es la respuesta inmunológica contra el primer antígeno HB conocido (que -- ahora habría de llamarse antígeno HB de superficie o HB_sAg) la responsable de la lesión hepática, probablemente porque sea este antígeno el que se incorpore a la membrana del hepatocito (en el supuesto de que la lesión esté producida por anticuerpos y complemento, o por linfocitos) o el único capaz de formar inmunocomplejos que lesionen el hígado (si la lesión fuera producida por inmunocomplejos).

V - C O N C L U S I O N E S
=====

- El Antígeno Australia o Antígeno de la hepatitis B (Ag HB) es o está íntimamente relacionado con el virus de la hepatitis B.

- El Ag HB posee un peso molecular elevado, por lo que sedimenta al ser centrifugado a altas velocidades (dos horas a 220.000 g. ó 16 horas a 68.400 g.).

- Es muy resistente al tratamiento con enzimas proteolíticas especialmente a la pepsina y la tripsina.

- Estas dos últimas propiedades nos han servido de base para la elaboración de un método de purificación del Ag HB, de mayor simplicidad que los hasta ahora descritos y que permite obtener antígeno de gran pureza con un rendimiento elevado a partir de sueros que lo contengan.

- El Ag HB purificado por nuestro método, presenta al microscopio electrónico partículas esféricas de unos 20 nm. de diámetro y tubulares de longitud variable con el mismo diámetro.

- Este Ag HB no contiene ácidos nucleicos en cantidad apreciable.

- El Ag HB es muy resistente al calor, perdiendo antes su cañidad infectante que su reactividad inmunológica.

- La obtención de este Ag HB muy purificado nos ha permitido montar un método de hemaglutinación pasiva (H.A.P.) para la determinación de anticuerpos anti-Ag HB (Ac HB), a la vez muy sensible y específico. Este método permite detectar Ac HB en sueros que contienen también Ag HB.

- También hemos montado un test de inhibición de la migración leucocitaria para medir la inmunidad celular frente al Ag HB. La utilización del antígeno muy purificado hace que este test sea de gran especificidad para el Ag HB.

- Mediante el test de H.A.P. hemos observado que entre la población normal existen Ac HB con gran frecuencia (24,4% en los controles sanos) siendo mayor la incidencia de estos anticuerpos a partir de la cuarta década de la vida. - No existen diferencias entre ambos sexos.

- Esta incidencia es aún mucho mayor en algunos grupos de personas que están más expuestos a materiales Ag HB positivos (enfermos ingresados repetidas veces en hospitales, enfermos con insuficiencia renal terminal en programa de hemodiálisis periódicas, donantes de sangre, personas trabajando en hospitales con material Ag HB positivo y familia-

res de enfermos Ag HB positivo que conviven con ellos), - si bien la mayoría de ellos no tienen antecedentes de haber padecido una hepatitis.

- En los familiares de enfermos portadores del Ag HB se observa una relación entre el grado de convivencia y la frecuencia de Ac HB.

- Estas observaciones indican la gran frecuencia de contagio con material Ag HB positivo, y que en la mayoría de los casos éste debe hacerse por vía no parenteral.

- Las personas que trabajan con materiales Ag HB positivo yaquellas que conviven mas estrechamente con enfermos portadores del antígeno tienen títulos de Ac HB. significativamente más elevados que aquellas personas que han padecido una hepatitis B. Esto parece indicar que los títulos elevados son producidos por estímulos antigénicos repetidos.

- Los enfermos hepáticos crónicos tienen una incidencia de Ag y Ac HB significativamente más elevada que personas de la misma edad y también con ingresos repetidos en hospitales. Esta mayor incidencia se hace a expensas únicamente del Ag HB. Se puede concluir por tanto que el virus de la hepatitis B puede producir hepatopatías crónicas, pero

sólo debe jugar un papel etiológico en aquellos enfermos que tienen Ag HB en sangre de forma persistente.

- Si dividimos estos enfermos hepáticos crónicos en bebedores y no bebedores los resultados obtenidos permiten afirmar que el virus de la hepatitis B solo juega un papel etiológico significativo en estos últimos.

- En la mayoría de los enfermos que padecen una hepatitis B, aparecen Ac HB a títulos bajos (entre 1/3 y 1/81) en el periodo de convalecencia. Se trata entonces de una respuesta primaria. En algunos, sin embargo los Ac HB están ya presentes desde el comienzo de los síntomas, alcanzando en general títulos más elevados ($\geq 1/81$). En estos casos se trata de una respuesta secundaria, que aparece en aquellas personas que han tenido previamente otro estímulo con el Ag HB.

- La existencia de hepatitis agudas acompañadas de una respuesta secundaria indica que un estímulo antigénico producido por el virus de la hepatitis B, no siempre deja una inmunidad total frente a la enfermedad.

- En la respuesta primaria aparecen siempre Ac HB de la clase IgM. Estos anticuerpos pueden desaparecer al cabo de algunos meses, pero en ocasiones persisten indefinidamente.

La presencia de anticuerpos IgM no permite por tanto asegurar que el estímulo antigénico sea reciente.

- Las personas que tras una respuesta primaria conservan Ac HB circulante a títulos elevados, sí quedan totalmente protegidas frente al virus de la hepatitis B. Solo -- aquellas personas en las que los Ac HB llegan a desaparecer o quedan títulos muy bajos (1/3) pueden padecer la enfermedad.

- Mediante el test de la migración leucocitaria hemos observado que no existe correlación en un mismo enfermo entre inmunidad humoral y celular frente al Ag HB. La protección frente a la infección por el virus de la hepatitis B, existente en las personas con títulos altos de Ac HB no puede por tanto depender de una inmunidad celular que acompañara sistemáticamente a esos anticuerpos.

- Si bien los Ac HB juegan un papel fundamental en la defensa contra el virus de la hepatitis B, no influyen en cambio en la curación del proceso. En efecto, en una epidemia de hepatitis B ocurrida en la unidad de hemodiálisis, hemos podido observar que la respuesta humoral frente al Ag HB está conservada en enfermos en programa de hemodiálisis periódicas. Sin embargo estos enfermos tienen una inmunidad celular globalmente disminuida. La gran mayoría de ellos tras una infección por el virus de la hepatitis B se transforman en portadores crónicos.

- La estrecha relación existente en esos enfermos y en todos aquellos que padecen una hepatitis aguda tipo B entre falta de respuesta celular al Ag HB (medida por el test de la inhibición de la migración leucocitaria) y -- persistencia del antígeno, permite afirmar que este tipo de respuesta inmunológica es la responsable de la curación de la enfermedad y de la eliminación del virus del organismo.

- Numerosas observaciones permiten afirmar que el virus de la hepatitis B tiene por sí solo muy poco poder patógeno y que la enfermedad depende de la aparición de una respuesta inmunológica frente al Ag HB en aquellos enfermos infectados por el virus.

- Las manifestaciones extrahepáticas de la enfermedad -- (artritis, rash cutáneo, glomerulonefritis, vasculitis), se ha demostrado que están producidas por complejos Ag-Ac HB.

- La patogenia de la lesión hepática por el contrario no está totalmente aclarada. Existe una relación clara entre su presentación y la existencia de una reacción inmunológica frente al Ag HB. Dado que la presencia y el título de Ac HB no parece influir en la evolución de una hepatitis aguda, hay que pensar que la producción de las lesiones

nes debe depender de una inmunidad celular que dañe los hepatocitos que contengan virus de la hepatitis B, probablemente por la existencia de determinantes antigénicos HB en su membrana. Esto está apoyado entre otras observaciones por la evolución mucho más benigna de la fase aguda de la hepatitis B, en aquellos enfermos que como los incluidos en un programa de hemodiálisis periódicas o los transplantados renales con tratamiento inmunosupresor tienen una inmunidad celular deprimida.

VI - BIBLIOGRAFIA
=====

AACH, R.D., GRISHAM, J.W., PARKER, C.W.- 1971.- Detection of Australia antigen by radioimmunoassay. Proc. Natl. Acad. Sc. USA. 68: 1056-60.

AACH, R.D.- HACKER, E.J., PARKER, C.W.- 1973.- Recognition of HB antigen determinants by a double label radioimmunoassay: A sensitive mean of subtyping hepatitis B antigen. J. Immunol. III:381-88.

AACH, R.D., ALTER, J.H., HOLLINGER, F.B., HOLLAND, P.V.- LANDER, J.J. MELNICK, J.L., WEILER, J.M.- 1974.- Risk of transfusing blood containing antibody to hepatitis B surface antigen. Lancet 2: 190-93.

AKDAMAR, K.A., MANMUS, L., CHERRIE, Eps.A., LEACH, R., WARREN, S.- 1971.- SH antigen in bile. Lancet 1:909.

ALLISON, Ac., 1967.- Cell-mediated immune response to virus infections and virus induced tumours.- Br. Med. Bull. 23: 60-65.

ALLISON, A.C.- 1974.- Interactions of antibodies, complement components and various cell types in immunity against viruses and pyogenic bacteria. Transpl. Rev. 19:3-55.

ALLISON, A.C., y BLUMBERG, B.S.- 1961.- An isoprecipitation reaction distinguishing human serum protein types. Lancet 1: 634-637.

ALMEIDA, J.D.- 1972.- Individual morphological variations - seen in Australia antigen positive sera. Amer. J. Dis. Chil. 123:303-309.

ALMEIDA, J.D., WATERSON, A.P.- 1969.- Immune complexes in hepatitis. Lancet II:983-986.

ALMEIDA, J.D., RUBENSTEIN, D., STOTT, E.J.- 1971 a.- New - antigen antibody system in Australia antigen positive hepatitis.- Lancet II:1225-1227.

ALMEIDA, J.D., CHRISHOLM, G.D., KULATILAKE, A.F., MC GREGOR, A.B., MACKAY, D.H., O'DONOGHNE, E.P.N.- SHACKMAN, R., WATERSON, A.P.- 1971 b.- Possible airborne spread of serum hepatitis virus within a haemodialysis unit. Lancet 2:849-850.

ALPERT, E., ISSELBACHER, K.J., SHUR, P.H., 1971.- The pathogenesis of arthritis associated with viral hepatitis. Complement-component studies.- New Engl. J. Med. 285:185-189.

ALPERT, E., SHUR, P.H., ISSELBACHER, K.J.- 1972.- Sequential changes of serum complement in HAA related arthritis. New - Engl. J. Med. 287:103.

- ALTER, H.J., BLUMBERG, B.S.- 1966.- Studies on a "new human isoprecipitin system". Australia antigen. Blood. 27:297:309.
- ALTER, H.J., HOLLAND, P.V., SCHMIDT, P.J., PLOTZ, P.H.- -- 1972.- Gamma globulin for hepatitis-virus B. Prevention or extension?. Lancet. 1: 1110-1111.
- APOSTOLOV, K., BAUER, D.J., SELWAY, J.W.T., FOX, R.A. DUDLEY, F.J., SHERLOCK, S., 1971.- Australia antigen in urine. Lancet 1: 1274-1275.
- ASHCAVAI, M., PETERS, R.L.- 1973.- Manual for hepatitis antigen testing. Saunders. 213.
- ASTOR, S.H., SPITLER, L.E., FRICK, L.L., FUDENBERG, H.H. - 1973.- Human leukocyte migration inhibition in agarose using four antigens: Correlation with skin reactivity. J. Immunol. 110-1174-1179.
- BAKER, A., CIDEL, J., KAPLAN, M.,-1971.- Australia antigen positive hepatitis complicated by acute polyarteritis. Gastroenterology 60:183.
- BANCROFT, WH., WARKEL, R.L., TALBERT, A.A., RUSSELL, P.K.- 1971.- Family with hepatitis associated antigen. Spectrum of liver pathology. JAMA 217: 1817-1820.
- BANCROFT, W.H., MUNDON, F.K., RUSSELL, P.K., 1972.- Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. J. Immunol. 109-842-848.
- BANKE; O., DYBKGAER, E., NORDENFELT, E., REINICKE, V.- 1971. Australia antigen and antibody in 10.000 Danish blood donors. Lancet 1:860-861.
- BARKER, L.F., SMITH, K.O., GEHLE, W.D., SHULMAN, N.R.-1969. Some antigenic and physical properties of virus like particles in sera of hepatitis patients. J. Immunol. 102:1529.
- BARKER, L.F., SHUMAN, N.R. MURRAY, R., HIRSCHMAN, R.J. RATNER, F., DIEFENBACH, W.C.L., GELLER, H.M.- 1970.- Transmission of serum hepatitis. JAMA 211:1509-1517.
- BARKER, L.F., PETERSON, M.R., SHUMAN, N.R., MURRAY, R.-1973. Antibody responses in viral hepatitis, type B.
- BAYER, M.E., BLUMBERG, B.S. WERNER, B.- 1968.- Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's syndrome and hepatitis. Nature 218: 1057.

BLAINEY, J.D., EARLE, A., FLEWETT, T.H., WILLIAMS, L.K.L.
1971.- Is the urine infective in serum hepatitis?. Lancet
1:797.

BLUMBERG, B.S.- Polymorphisms of serum proteins and the -
development of isoprecipitins in transfused patients. Bull.
N.Y. Acad. Med. 40:377-386.

BLUMBERG, B.S.- 1966.- An inherited serum isoantigen in -
leukaemia and Down's syndrome. J. Clin. Invest. 45:988-

BLUMBERG, B.S., GIGER, K.- 1970.- Hepatitis in haemodialy-
sis units. New Engl. J. Med. 283:657-658.

BLUMBERG, B.S., ALTER, H.J., RIDDELL, N. ERLANDSON, M.-
1964.- Multiple antigenic specificities of serum lipopro-
teins detected with sera of transfused patients. Vox Sang.
9:128-145.

BLUMBERG, B.S., ALTER, H.J., VISNICH, S.- 1965.- A "new" -
antigen in leukaemia sera. J.A.M.A. 191:541-546.

BLUMBERG, B.S., GESTLEY B.J.S., HUNGERFORD, D.A., LONDON,
W.T., SUTNICK, A.I.- 1967. A serum antigen (Au Ag) in Down's
syndrome leukaemia and hepatitis. Ann. Intern. Med. 66:924-
931.

BLUMBERG, B.S., SUTNICK, A.I., LONDON, W.T.- 1968.- Hepati-
tis and leukaemia. their relation to Australia antigen. --
Bull. N.Y. Acad. Med. 44:1566.

BLUMBERG, B.S., LONDON, W.T., SUTNICK, A.I., MILLMAN, I.-
1970^a- Australia antigen, hepatitis and susceptibility to
leukaemia in comparative leukaemia research. Bibl. Haema-
tol. 36:659-677.

BLUMBERG, B.S. SUTNICK, A.I., LONDON, W.T.- 1970 b.- Aus-
tralia antigen As a hepatitis virus: variation in host -
response. Amer. J. Med. 48:1-8.

BLUMBERG, B.S. MILLMAN, I., SUTNICK, A.I., LONDON, W.T.-
1971.- The nature of australia antigen and its relation to
antigen-antibody complex formation. J. Exp. Med. 134:320s-
329s.

BLUMBERG, B.S., SUTNICK, A.I. m LONDON, W.T., MILLMAN, I.-
1973.- Australia antigen in "the liver"(International Acade-
mic of pathology monograph). The Williams and Wilkins Compa-
ny. Baltimore. Pág. 269-285.

BOSCH, J., BRUGUERA, M. RODES, J.- 1973.- Family spread -
of type B hepatitis. Lancet. II-457:

BRADLEY, W.H.- 1946.- Homologous serum jaundice . Proc. - Roy. Soc. Med. 39:649-654.

BRIERZ, A.M., WOHLBERG, C., ROSENTHAL, J., MAGE, M., NOTKINS, A.L.- 1971.- Inhibition or enhancement of immunological injury of virus infected cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 68:3073.

BRITISH MEDICAL JOURNAL (ed.)- 1974.- Hepatitis and herpes virus. III:484.

BRUGUERA, M., MARAGALL, S., CABALLEIRA, J., RODES, J. TERES, J., CASTILLO, R.- 1972.- El antígeno Australia en la cirrosis hepática. Rev. Clin. Esp. 124:249-254.

BRUGUERA, M., BOSCH, J., RODES, J.,-1973a.- Family outbreak of hepatitis B. New Engl. Med. 289, 1144.

BRUGUERA, M., BOSCH, J., RODES, J., GILBERT QUERALTO, J.- 1973 b.- Hepatitis vírica en el personal sanitario. Experiencia en el Hospital Clínico y Provincial de Barcelona. Med. Clin. 60:302-308.

CAMERON, C.H., DANE, D.S., 1974.- Viruses. Br. Med. Bull. 30:90-92.

CHALMERS, T.C.- 1973.- Haemodialysis associated hepatitis. J.A.M.A. 225:412-414.

CHAUDHARY, R.K., PERRY, R.E.- 1973.- Pleomorphic particles associated with hepatitis B antigen from blood donors. New Engl. J. Med. 289:752-753.

CHRISTIE, I.L., ISLAM, M.N., BANATBALA, K.E., CAYZER, I.- 1974.- Clinical evaluation of the turkey-erythrocyte passive-haemagglutination test for hepatitis B surface antigen. Lancet 1:1193-1194.

CLAUSEN, J.E.- 1971.- Tuberculin induced migration inhibition of human peripheral leucocytes in agarose medium. Acta Allergol. 26:56-80.

CLAUSSEN, J.E.-1973 a.- Tuberculin induced migration inhibition of human peripheral blood leucocytes after 2,4 and 20 hours in agarose culture. Acta Allergol. 28:28-41.

CLAUSSEN, J.E. 1973 b.- Comparison between capillary tube and agarose migration technique in the study of human peripheral blood leucocytes. Acta Allergol. 28:145-158.

- CLAUSSEN, J.E.- 1973 c.- Dose effect relationship between tuberculin concentration and tuberculin induced migration-inhibition of human peripheral blood leucocytes demonstrated by agarose migration technique. Acta Allergol. 28:159-171.
- CLAUSSEN, J.E.- 1973 d.- Leucocyte migration agarose test: Inability to transfer tuberculin hypersensibility by incubating nonsensitive leucocytes with plasma from persons -- with tuberculin sensitive leucocytes. Acta Allergol. 28: -172-179.
- CLAUSSEN, J.E.- 1973 e.- Leucocyte migration agarose technique: Some technical details. Acta Allergol. 28:351-364.
- COLE, G.A., PRENDERGAST, R.A., HENNEY, C.S.- 1973.- In vitro correlated of LMC virus induced immune response. En: - lymphocytic choriomeningitis and other arenavirus. Ed: -- Lehmann-Grubbe F. Springer. Berlin.
- COLE, C.A., NATHANSON, N., PRENDERGAST, R.A.- 1972.- Requirement for θ bearing cells in lymphocytic choriomeningitis induced central nervous system disease. Nature 238:335.
- COMBES, B., SHOREY, J., BARRERA, A., STASMY, P., EGENBRADT, E.H., HULL, A.R. CARTER, N.W.- 1971.- Glomerulonephritis - with deposition of Australia antigen-antibody complexes in glomerular basement membrane. Lancet II:234-237.
- COOPER, M.D., CHASE, H.P., LOWMAN, J.T., KRIVIT, W. GOOD, R.A.- 1968.- Wiskott aldrich syndrome: An immunological deficiency disease involving the afferent limb of immunity.- Amer. J. Med. 44; 499-513.
- COS ARREGUI, E., FERNANDEZ PACHECO, A., VELO BELLEVER, J.R., ROBLES FORNIELES, J., ALCALA SANTAELLA; R.- 1973.- Incidencia familiar de hepatitis crónica antígeno Australia positivas. Rev.Esp. Enf. Ap. Dig. XLI:945.
- COSSART, Y.E., 1972 a.- What is Australia antigen. Amer. J.Dis. Chil. 123: 321-322.
- COSSART, Y.E.- 1972 b.- What determines the incidence of - serum hepatitis after blood transfusion. Amer. J. Dis Chil. 123: 354-356.
- COSSART, Y.E., VAHRMAN, J.- 1970.- Studies of Australia-SH antigen in episodic viral hepatitis en London. Br.Med. J. I-403-405.
- COSSART, Y.E., BOXALL, E., FLEWETT, T..H. 1973.- False negative radioimmunoassay tests for australia antigen. Lancet II-1333-1334.

COYNE, V.E., MILLMAN, I., CERDA, J., GERSTEY, B.J.S. LONDON, T., SUTNICK, A., BLUMBERG, B.S., -1970.- The localization of Australia antigen by immunofluorescence. J. Exp. Med. 131: 307-315.

DAMMIN, G.J., COUCH, N.P., MURRY, J.E., - 1957.- Prolonged survival of skin homografts in uremic patients. Ann. N.W. Acad. Sci. 64:967-976.

DANE, D.S., CAMERON, C.H., BRIGGS, M., -1970.- Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen associated hepatitis. Lancet I-695-698.

DAVID, J.R.-ALASHAN, S., LAWRENCE, H.S., THOMAS, L., -1964 a Delayed hypersensitivity in vitro. I the specificity of inhibition of cell migration by antigens. J. Immunol. 93:264-273.

DAVID, J. R., LAWRENCE, H.F., THOMAS, L., -1964 b.- Delayed hypersensitivity in vitro. II Effect of sensitive cells on normal cells in the presence of antigen. J. Immunol. 93: 274-282.

DAVID, J.R., SCHLOSSMAN, S.F.- 1968.-Immunochemical studies on the specificity of cellular hypersensitivity; J. Exp. Med. 128: 1451-1459.

DEUSTSCH, G.F., SPENCE, L.-1972.- Virus-like particles in the liver and their relationship to Australia antigen. Lancet I-447.

DOHERTY, P.C., ZINKERNAGEL, R.M.- 1974.- T cell mediated -- immunopathology in viral infections. Transplant. Rev. 19: 89-120.

DOURDOUREKAS, D., VITTAL, S.B.V., CLOWDUS, B.F., STEIGMANN, -1973.- Duration of HB antigenemia. New. Engl. J.Med. 289:377-378.

DUDLEY, F.J., FOX, R.A., SHERLOCK, S.- 1971.- Relationship of hepatitis-associated-antigen (H.A.A.) to acute and chronic liver injury. Lancet II-13.

DUDLEY, F.J., FOX, R.A., SHERLOCK, S.- 1972 a.- Cellular immunity and hepatitis associated Australia antigen liver disease. Lancet I-723-726.

DUDLEY, F.J., GIUSTINO, V., SHERLOCK, S.-1972 b.- Cell mediated immunity in patients positive for hepatitis-associated-antigen. Br. Med.J. 4:754-756.

DUDLEY, F.J., O'SHEA, M.J., SHERLOCK, S.- 1973.- Serum auto-antibody in hepatitis-associated antigen (H.A.A.) positive patients. Clin. Exp. Immunol. 13: 367-372.

- EDGINGTON, T.S.- RIFE, D.J.,-1971.- Intrahepatic expression of serum hepatitis virus associated antigens. J.Exp. Med. - 134:871-885.
- FARROW, L.J., LAMB, S.J., COGHILL, N.F., LINDON, R.L., PREECE, J., ZUCKERMAN, A.J., STEWART, J.S.- 1974.- Hepatitis B antigen in viral hepatitis in west London. Br. Med.J. 3:83-86.
- FAULK, W.P., HOUBA, V.- 1973.- Citado por POSTON, R.N. (1974)
- FEINMAN, S.V., BERRIS, B., SINCLAIR, J.C., WROBEL, D.M., ALTER, H.J., HOLLAND, P.V.- 1973.- Relation of hepatitis B antigen subtypes in symptom free carriers to geographical origin and liver abnormalities. Lancet II-867-869.
- FINDLAY, G.M., MARTIN, N.H., MITCHELL, J.B.- 1944.- Hepatitis after yellow fever inoculation:relation to infectious hepatitis . Lancet 2:365-370.
- FINDLAY, G.M., WILLCOX, R.R.- 1945.-transmission of infective hepatitis by faeces and urine. Lancet I:212.
- FREI, P.C., ERARD, Ph.-ZINKERNAGEL, R.,-1973.- Cell mediated immunity to hepatitis-associated-antigen (H.A.A.) demonstrated by leucocyte migration test during and after acute B hepatitis. Biomedecine. 19:379-383.
- FULFORD, K.W.M., DANE, D.S., CATTERALL, R.D., WOOF, R., DENNING, J.V.- 1973.- Australia antigen and antibody among patients attending a clinic for sexually transmitted diseases. Lancet 1 -1470-1473.
- GAST, G.C., HOUWEN, B., NIEWAG, H.D.,- 1973.-Specific lymphocyte stimulation by purified, heat-inactivated hepatitis B antigen. Br. Med. J. 4:707-709.
- GAVRILA, I., PASCARIU, C., ONESCIUC, I., FETICU, M., CRISAN, M.,-1972. Hepatitis associated antigen and specific antibodies in sera of convalescents and patients with viral hepatitis. J. Inf. Dis. 126:200-202.
- GEORGE, M., VAUGHAN, J.H.,-1962.-In vitro cell migration as a model mfor delayed hypersensitibity. Proc. Sox. Exp. Biol. Med. 111:514.521.
- GERBER, M.J., VITAL, S.B.V., CLOWDUS, B.F.,-1972.-Hepatitis virus B and chronic alcoholic liver disease. Lancet 2:1034-1035.
- GERIN, J.L., PURCELL, R.H., HOGGAN, M.D., HOLLAND, T.V., --CHANOCK, R.M.,-1969.- Biophysical properties of Australia antigen. J. Virol. 4:763-768.

GERIN, J.L., HOLLAND, P.V., PURCELL, R.H.- 1971.- Australia antigen: Large scale purification from human serum and biochemical studies of its proteins.- J. Virol. 7:569-576.

GILES, J.P., MC COLLUM, R.W., BERNDTSON, L.W., KRUGMAN, S.- 1969.- Relation of Australia/SH antigen to the willowbrook M-S-2 strain.- New.Engl. J. Med. 281:119.

GILES, J.P., KRUGMAN, S.,- 1972.- Viral hepatitis: Differential diagnostic features between infections with type A and B. viruses. Amer.J.Dis.Chil. 123:281-282.

GINSBERG, A.L., BANCROFT, W.F., CONRAD, M.E.- 1972.- Simplified and extensive detection of subtypes of Australia antigen using a solid phase radioimmunoassay. J.Lab.Clin.Med. 80:291-296.

GIUSTINO, W., DUDLEY, F.J.- SHERLOCK, S.-1972.- thymus-dependent lymphocyte function in patients with hepatitis-associated-antigen. Lancet 2:850-853.

GOCKE, D.J.- 1972.- A prospective study of posttransfusion hepatitis. The role of Australia antigen. J.A.M.A. 219:1165-1170.

GOCKE, D.J., HSU, K., MORGAN, C., BOMBARDIERI, S., LOCKSHIN, M., CHRISTIAN, C.L.- 1971.- Vasculitis in association with Australia antigen. J.Exp. Med. 134:330-336.

GOCKE, D.J., HOWE, C.-1970.- Rapid detection of Australia antigen by counter immunoelectrophoresis. J. Immunol. 104:1031-1034.

GOLD, E.R., FUDENBERG, H.H.,-1967.- Chromic chloride: A coupling reagent for passive hemagglutination reactions.-J.Immunol. 99: 859-866.

GOLD, J.W.M., ALTER, H.J., HOLLAND, P.V.-, GERIN, J.L, PURCELL, R.H.- 1974.- Passive hemagglutination assay for Antibody to -- subtypes pf hepatitis B. Antigen. J. Immunol. 112:1100-1106.

GONZALEZ MOLINA, A.A., RODRIGO MORENO, M., MARTIN GARCIA, L.M., SERRA ESTELLES, L., BAGUENA CANDELA, J., SANCHEZ CUENCA, J.M.- 1973.- Incidencia del antigeno Australia (HAA) en 12.560 donantes de sangre. Med. Clin. 61:245-247.

GOMEZ DE LA CONCHA, E.-, EGIDO DE LOS RIOS, J., ORTIZ MASLLORENS, F., HERNANDO AVENDAÑO, L.- 1974.- Immunity to hepatitis-B in - a haemodialysis unit. Lancet 2:461.

GRADY, G.F., BENNET, J.E.,-1970.- Prevention of posttransfusion hepatitis by gamma-globulin. J.Amer. Med. Ass. 214:140-142.

GRANGE, M.J., ERLINGER, S., TEILLET, F., SCHLEGEL, N.- 1973.- A possible relationship to treatment between HAA and chronic persistent hepatitis in Hodgkin disease. Gut. 14:433-437.

GREGG, M.B.- 1972.- The changing epidemiology of viral hepatitis in the United States. Amer.J.Dis.Chil. 123:350-354.

GROB, P.J., JEMELKA, H.- 1971.a Fecal SH (Australia) antigen in acute hepatitis. Lancet 1:206-208.

GROB, P.J., JEMELKA, H.- 1971 b.- Antibodies against Australia antigen in laboratory personnel.- Lancet. 1:77.

GUARDIA, J., BACARDI, R., HERNANDEZ, J.A., MARTINEZ, J.M.- 1970 a Screening blood-donors for Australia antigen. Lancet 2:465.

GUARDIA, J., BACARDI, R., GRAS, J.,-1970 b.- Antígeno y anticuerpos Au/SH en las hepatopatías agudas y crónicas. Med. Clín. - 54:341.

GUARDIA, J., MARTINEZ, J.M., BACARDI, R., GRAS, J., HERNANDEZ, J.M.- 1971 a.- Comparación entre la inmunodifusión y la electroinmunodifusión en la detección del sistema Australia en diversas hepatopatías. Med. Clín. 56:335-338.

GUARDIA, J., MARTINEZ, J.M., MARSAL, J., BACARDI, R.-1971 b.- Observaciones al microscopio electrónico del antígeno Australia. Med. Clín. 57:43-48.

GUARDIA, J., MARTINEZ, J.M., MARSAL, J., FERRAGUT, A., BACARDI, R.-1972.- Les complexes immuns au cours des hépatites virales. L'hépatite fulminante. Presse Med. 1:1963.

HADZIYANNIS, S.T.,-1972.- Immunofluorescence detection of small amounts of circulating Australia antibody . 7 th. meeting Eur. Ass. Study liver (Abstracts) 9 8:247.

HADZIYANNIS, S.T., MERIKAS, G.E.- 1970.- Australia antigen in a family . Lancet. 1-1057-1058.

HADZIYANNIS, S.T.-VISSOULIS, C.H., MOUSSOUROS, A., AFROUDAKIS, A.-1972.- cytoplasmic localization of Australia antigen in the liver. Lancet 1:976-979.

HEATHCOTE, J., SHERLOCK, S.-1973.- Spread of acute type B hepatitis in London. Lancet 1:1468-1470.

HEATHCOTE, J., TSIANIDES, S., SHERLOCK, S.- 1973.- A urinary substance in patients with acute type B Hepatitis and their household contacts. Lancet 2-593-595.

HEATHCOTE, J. CAMERON, C.H., DANE, D.S.-1974 a.- Hepatitis B antigen in saliva and semen. Lancet 1:71-75.

HEATHCOTE, J.-, GATEAU, P.H., SHERLOCK, S.-1974 b.- Role of hepatitis B antigen carriers in non parenteral transmission of hepatitis B. Lancet 2:370-372.

HENIGST, W.- 1973.- Sexual transmission of infections associated with hepatitis-B antigen. Lancet 2-1395.

HERNANDEZ GUIO, G., OJEDA, C., ORTIZ MASLLORENS, F.- 1973.- Incidencia familiar del Antígeno Australia. Estudio de tres familias. Comunicación a la IV Reunión Nacional de Hepatología. Extracto: Rev. Esp.Enf.Ap.Dig. XLII:943.

HERSH, T., MELNICK, J.L., GOYAL, R.K., HOLLINGER, F.B.-1971.- Non parenteral transmission of viral hepatitis type B (Australia antigen-associated serum hepatitis). New. Engl. J.Med. -- 285:1363-1364.

HIRATA, A.A., EMERICK, A.J., BOLEY, W.F.-1973.- Hepatitis B - virus antigen detection by reverse passive hemagglutination. Proc.Soc.Exp. Biol. Med. 143:761-763.

HIRSCHMAN, R.J., SHULMAN, N.R., BARKER, L.F., KENDALLOS, - - 1969.- Virus like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis. J.A.M.A. 208:1667-1670.

HOLLAND, P.V., PURCELL, R.H., SMITH, H., ALTER, H.J.-1972.- Subtyping of hepatitis-associated antigen (HBAg) simplified technique with counterelectrophoresis. J.Immunol. 109:420-425.

HOLLINGER, F.B.-, VORNDAN, V., DREESMAN, G.R.- 1971.- Assay of Australia antigen and antibody employing double-antibody and solid phase radioimmunoassay techniques and comparison with the passive hemagglutination methods. J. Immunol. 107:1099-111.

HOOFNAGLE, H.J., GERETY, R.J., BARKER, L.F.- 1973.- Antibody to hepatitis B virus core in man. Lancet 2:869-873.

HOUWEN, B., MARRINK, J., VOS, J., MOLENAAR, I., NIEWEG, H.O.- 1973.- Vox sanguinis Suppl. 24:114. (Citado por GAST y cols. 1973).

HUANG, S.N.- 1971.- Hepatitis-associated-antigen hepatitis: - An electronic microscopic study of virus-like particles in liver cells. Amer.J.Pathol. 64:483-500.

HUANG, S.N., MILLMAN, I., O'CONNELL, A.P., BLUMBERG, B.S., -- ARONOFF, A., GAULT, H.,-1972.- Electron microscopic and immunoelectromicroscopic studies of virus particles in human liver with Australia-antigen-associated hepatitis. Gastroenterology 62:181.

HUGGINS, C.E.-1970.- Hepatitis in haemodialysis units. New. - Engl.J.Med. 283:657.

IMAI, M., GOTOH, A., NISHIOKA, K., KURASHINA, S., MIYAKAWA, Y., MAYUMI, M.-1974.- Antigenicity of reduced and alkylated Australia antigen. J. Immunol. 112:416-419.

IRWIN, G.R., ALLEN, A.M., BANCROFT, W.H., KARWACKI, J.J., PINKERTON, R.H., RUSSELL, P.K.- 1974.- Hepatitis B antigen and antibody: Occurrence in families of asymptomatic antigen HB carriers. J.A.M.A. 227:1042-1043.

JACKSON, D.R., MC CRATH, P.P., BARKER, L.F.- 1973.- Nucleo capsid "core" particles of hepatitis B virus from liver of an experimentally infected chimpanzee. 31 st. Annual Proceedings of the Electron Microscopy Society of America, New Orleans -- 1973. (Citado por Brzosko 1974).

JANDE, J.H., SIMMONS, R.L.,-1957.- Br.J. Hematol. 3:19.(Citado por POSTON, R.N. 1974).

JAVITT, N.B.- 1973.- Chronic active hepatitis. Amer. J. Med. 55:733-735.

JAVITT, N.B., HAND, R., FINLAYSON, N.D.C.-1973.- Persistent viral hepatitis. Amer. J. Med. 55:799-1810.

JEFFRIES, D.J., JAME, W.H., JEFFRIES, F.J.G., MC LEOD, K.G., WILLCOX, R.R.- 1973.- Australia (Hepatitis-associated) antigen in patients attending a venereal disease clinic. Br. Med.J. - 2:455-456.

JORDAN, M.C. ROUSSEAU, W.E., TEDTMEIER, G.F., NOBLE, G.R., MUTH R.G., CHIN, T.D.Y., 1973.- Immunogenicity of inactivated influenza virus vaccine in chronic renal failure. Ann. Int. Med. 79:790-794.

JOZWIAK, W., KOSCIELAK, J., MADALINSKI, K., BRZOSKO, W.J., -- NOWOLAWSKI, A., KLOCZEWIAK, M.,-1971.- RNA in Australia antigen Nature. New Biol. 229-92-94.

KAPLAN, M.M., GRADY, G.- 1971.- Serum hepatitis antigen in --- chronic hepatitis and primary biliary. Cirrhosis 1:159-161.

KAPLAN, M.M., GREENMAN, R.L., GERIN, G.L., PURCELL, R.H., ROBINSON, W.S.- 1973.- DNA polymerase associated with human hepatitis B. J. Virol. 12:995-1005.

KATER, L.- BORST-EILERS, E., VAN GORP, L.H.- 1972.- Immune -- complexes in viral hepatitis. Lancet 1:447.

KATER, L., SCHMITZ DU MOULIN, F., BORST-EILERS, E.- 1974.- A rapid haemagglutination test for hepatitis B antigen. Lancet 1)947-949.

KEM, D.N.S.- 1973.- Specific immunoglobulin for prevention of serum hepatitis. Lancet 2:627.

KIM, C.Y., BISSELL, D.M.-1970.- Stability of lipid and protein of hepatitis-associated (Australia) antigen. J. Infect. Dis. -- 123:47)476.

- KIM, C.Y., TILLES, J.G.- 1971.-Immunologic and electrophoretic heterogeneity of hepatitis associated antigen. J. Infect. Dis. 123:618.
- KIM, C.Y., SPANO, J., CLARK, G.E.- Use of pepsin-treated hepatitis associated antigen in the production of precipitating antibody. J. Infect. Dis. 124:411-414.
- KIM, C.Y., TILLES, J.G.- 1973.- Purification and biophysical characterization of hepatitis B antigen. J. Clin. Invest. 52: 1176-86.
- KNIGHT, A.H., FOX, R.A., BAILLOD, R.A., NIAZI, S.P., SHERLOCK, S., MOORHEAD, J.F.- 1970.- Hepatitis associated antigen and antibody in haemodialysis patients and staff. Br.Med. J. 3:603-606.
- KOFF, R.S., ISSELBACHER, K.J.- 1968.- Changing concepts in the epidemiology of viral hepatitis. New. Engl.J.Med. 285:1364.
- KROHN, K., FINLAYSON, N.D.C., JOKELAINEN, P.T., ANDERSON, K.E., PRINCE, A.M.- 1970.- Electron microscopical and immunological observations on the serum-hepatitis (S.H.) antigen in primary biliary cirrhosis. Lancet II:379-383.
- KRUGMAN, S., GILES, J.P., HAMMOND, J.- 1967.- Infections hepatitis: Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. J.A.M.A. 200:365.
- KRUGMAN, S., GILES, J.P.,- 1970.- Viral hepatitis. New light on an old disease. J.A.M.A. 212:1019-1029.
- KRUGMAN, S., GILES, J.P., HAMMOND, J.- 1970.- Hepatitis virus: Effect of heat on the infectivity and antigenicity of the MS-1 and MS-2 strains. J. Infect. Dis. 122:432-436.
- KRUGMAN, S., GILES, J.P., HAMMOND, J.- 1971 a.- Viral hepatitis type B (MS-2 strain): Studies on active immunization. J.A.M.A. 217:41-45.
- KRUGMAN, S., GILES, J.P., HAMMOND, J.- 1971 b.- Viral hepatitis type B (MS-2 strain) prevention with hepatitis B immune serum globulin. J.A.M.A. 218:1665-1670.
- KRUGMAN, S., GILES, J.P.,- 1972.- Informe a la 2ª Conferencia de trabajo sobre subtipos antigénicos del Antígeno Australia. Hepatitis Scientific Memoranda (NIH). Feb-Marzo pág. 7.
- KRUGMAN, S., GILES, J.P.- 1973.- Viral hepatitis type B. (MS-2 strain) Further observations on natural history and prevention. New. Engl. J.Med. 288:775-760.

- LAITINEN, O., VAHERI, A.- 1974.- Very high measles and rubella virus antibody titres associated with hepatitis, systemic lupus erythematosus, and infections mononucleosis. *Lancet* 1: 197-198.
- LANCET, (Ed.).- 1973 a.- Australia Antigen. The Pace Quickens. I:85.
- LANCET (Ed.).- 1973 b.- Deeper into hepatitis B.- II:887-888. (20 Oct.)
- LANDER, J.J., GILES, J.P., PURCELL, R.H., KRUGMAN, S.- 1971 Viral hepatitis type B (MS-2 Strain) detection of antibody after primary infection.
- LANDER, J.J., HOLLAND, P.V., ALTER, H.J., CHANOCK, R.M., - PUCELL, R.H.- 1972.- Antibody to hepatitis-associated-antigen frequency and pattern of response as detected by radio-immunoprecipitation. *J.A.M.A.* 220:1079-1082.
- LE BOUVIER, G.L.- 1971.- The heterogeneity of Australia antigen. *J.Infect. Dis.* 123:671.
- LE BOUVIER, G.L, MC COLLUM, R.W., HIERHOLZER, W.J., IRWIN, G. R., KRUGMAN, S., GILES, J.P. 1972.- Subtypes of Australia antigen and hepatitis B virus. *J.A.M.A.* 222:928-930.
- LE BOUVIER, G.L.- 1973.- Subtypes of Hepatitis B antigen: Clinical relevance?. *Ann. Int. Med.* 79:894-896.
- LEERS, W.D., KOUROUPIS, G.M.- 1973.- R.I.A. kit for assay of hepatitis-B antigen. *Lancet* 2:1334-1335.
- LEVENE, C., BLUMBERG, B.S.- 1969.- Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. *Nature.* 221:195-196.
- LIWAH, A.A.C., CHAUSHURI, A.K.R., ANDERSON, J.R.- 1973.- Lymphocyte transformation and leukocyte migration-inhibition by Australia antigen. *Clin. Exp. Immunol.* 15:27-34.
- LIEW, F.Y., PARISH, C.R.- 1972.- Regulation of the immune response by antibody. I Suppression of antibody formation and concomitant enhancement of cell-mediated immunity by passive antibody. *Cell. Immunol.* 4:66-85.
- LING, C.M., OVERBY, L.R.- 1972.- Prevalence of hepatitis B -- virus antigen as revealed by direct radioimmunoassay with -- ¹²⁵I-antibody. *J. Immunol.* 109:831-834.
- LODMELL, D.L., NIWA, A., HAYASHI, K., NOTKINS, A.L.- 1973.- Prevention of cell-to-cell spread of herpes simplex virus by leukocytes. *J.Exp. Med.* 137:706-720.

- LOEB, L.A., WILLIAMS, R.O., SUTNICK, A.I.- 1973.- D.N.A. polymerase activity in human serum: Studies with Australia antigen. Proc.Soc. Exp. Biol. Med. 43:519-525.
- LONDON, W.T., DI FIGLIA, M., SUTNICK, A.I., BLUMBERG, B.S.- - 1969.- An epidemic of hepatitis in a chronic hemodialysis unit. Australia antigen and differences in host response. New. Engl. J.Med. 281:571-578.
- LORETZ, R.L, KLAUS, D.R., RITMAN, S., DAMUS, K.H., GITNICK, -- G.L.- 1973.- Posttransfusion hepatitis in recipients of blood screened by newer assays. Lancet 2-694-696.
- LUX, S.E., JOHNSON, R.B., AUGUST, C., SAY, B. & PERCHASZAHED, B. ROSEN, F.S., MC KUSICK, V.A.- 1970.- Chronic neutropenia and abnormal cellular immunity in cartilage-hair hypoplasia. New Engl.J.Med. 282:231-236.
- MAGALLON MARTINEZ, M.- 1972.- Aspectos físico-químicos inmunológicos y epidemiológicos sobre el antígeno asociado a la hepatitis. Sangre XVII:1-24.
- MAGNIUS, L.O., ESRMAK, J.A.- 1972.- New specificities in Australia antigen positive sera distinct from LE BOUVIER determinants. J.Immunol. 109-1017-1021.
- MARDOMINGO VARELA, P., DIAGO, A., MIÑO, G., PEREZ, A. & 1974.- El antígeno Australia y su significación en patología hepática. Medicamenta LXIII:97-104.
- MARMION, B.P., TONKIN, R.W.- 1972.- Control of hepatitis in dialysis units. Br. Med. Bull. 28:167-169.
- MARTINEZ VAZQUEZ, J.M.-1974.- Fenómenos inmunológicos en las hepatopatías crónicas en relación al Antígeno Australia y a la proteína beta-1A/1C (C3). Resumen de tesis doctoral. Med. Clin. 62:75:82.
- MARTINEZ VAZQUEZ, J.M., VIDAL, M.T., GUARDIA, J., VILASECA, J. FERRAGUT, A., TORNOS, J., BACARDI, R.- 1973.- Localización del antígeno Australia en el interior del hepatocito mediante inmunofluorescencia. Med. Clin. 60:200-202.
- MARTINEZ VAZQUEZ, J.M. GUARDIA, J., VILASECA, J., PEDREIRA, J., VILLALONGA, C., GALLART, M.T., HERNANDEZ, J.M., TORNOS, J., BACARDI, R.- 1974.- Valor pronóstico del test de la inhibición de la migración leucocitaria frente al antígeno de la hepatitis B en la hepatitis aguda. Med. Clin. 63:63-66.
- MATILLA GOMEZ, V.- 1971.- El antígeno Australia y sus anticuerpos específicos, relacionados con la transfusión de sangre. - Arch. Fac. Med. Madrid XVII:11-112.

MAUGH II, T.H.- 1972.- Hepatitis: A new understanding emerges. Science. 176:1225-1226.

MAYNARD, J.E., BERQUIST, K.R., KRUSHAK, D.H., PURCELL, R.H.- 1972.- Experimental infection of chimpanzees with the virus of hepatitis B. Nature 237:514-515.

MAZZUR, S.- 1973.- Menstrual blood as a vehicle of Australia antigen transmission. Lancet 1:749.

MAZZUR, S., FALKER, D., BLUMBERG, B.S.- 1973.- Geographical variation of the "w" subtype of Australia antigen. Nature New Biol. 243:44-47.

MAZZUR, S.-BURGERT, S., BLUMBERG, B.S.- 1974 a.- Geographical distribution of Australia antigen determinants d, y and w. Nature 247:38-40.

MAZZUR, S.- BLUMBERG, B.S., FRIEDLAENDER, J.S.- 1974 b.- Silent maternal transmission of Australia Antigen. Nature 247: 41.

MC CALLUM, R.W., BRADLEY, W.H.- 1944.- Transmission of infective hepatitis to human volunteers. Lancet 2:228.

MC CALLUM, R.W.,- 1969.- Serum antigens in viral hepatitis. J. Infe. Dis. 120:641.

MC CALLUM, R.W.- 1972.- Epidemiology of infections with hepatitis B virus. Amer. J. Dis. Chil. 123:364-367.

MELARTIN, L., y BLUMBERG, B.S.- 1966.- Production of antibody against "Australia Antigen" in rabbits. Nature 210:1340.

MELARTIN, L., PANELIUS, M.- 1969.- Occurrence of Australia antigen in Finish mongolism patients. Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 45:157-158.

MERRIGAN, T.C.- 1974.- Host defenses against viral diseases. New. Engl. J. Med. 290:323-329.

MERRILL, D.A., DUBOIS, R.S.- KOHLER, P.F.- 1972.- Neonatal onset of hepatitis-associated antigen. New. Engl. J. Med. 287:1280.

MILLER, D.G.- 1968.- The immunologic capability of patients with lymphoma. Cancer Res. 28:1441-1450.

MILLMAN, I., ZAVATONE, V., GESTLEY, B.J.S., BLUMBERG, B.S.- 1969.- Australia antigen detected in the nucleoid of liver cells of patients with viral hepatitis detected by the fluorescent antibody technique. Nature 222:181-184.

MILLMAN, I., HUHTANEN, H., MERINO, F., BAYER, M.E.- BLUMBERG, B.S.- 1971.- Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 2:667-686d (Citado por Sutnick y cols. 1972 a. ...)

- MILLMAN, I., LOEB, L.A., BAYER, H.F., BLUMBERG, B.S.- 1970 a Australia antigen (a hepatitis associated antigen). Purification and physical properties. J.Exp. Med. 131:1190-1199.
- MILLMAN, I., LONDON, W.T., SUTNICK, A.I.- 1970 b.- Australia antigen antibody complexes. Nature. 226:83-84.
- MILNE, G.R., BARR, A., WALLACE, J.,- 1971.- Total screening of blood donations for HAA and anti HAA.- Lancet 1:77.-
- MITCH, W.E., WANDS, J.R., MADDREY, W.C.- 1974.- Hepatitis B transmission in a family. J.A.M.A. 227:1043,1044.
- NEURATH, A.R., COSIO, L., PRINCE, A.,- 1973.- Hepatitis B antigens: Separation of two populations differing in particle size distribution. Proc.Soc.Exp. Biol.Med. 143:440-445.
- NEWBERRY, W.M., SANDFORD, J.P.,- 1971.- Defective cellular immunity in renal failure: Depression of reactivity of lymphocytes to phytohemagglutinin by renal failure serum. J. Clin. Invest. 50:1262-1271.
- NEW ENGLISH JOURNAL MEDICAL.(Ed.) 1970.- Control of hepatitis on haemodialysis units. 282:1488.
- NIELSSEN, J.O., DIETRICKSON, O., ELLINF, P.- 1971.- Incidence and meaning of persistence of Australia antigen in patients with acute viral hepatitis: Development of chronic hepatitis. New.Engl. J.Medi 285:1157-1160.
- NIELSSEN, J.O., NIELSEN, M.H., REINICKE, V.- 1972.- Absence of Dane particles in Australia antigen carriers with a histologically normal liver. Lancet. 2:934.
- NIELSSEN, J.O., LE BOUVIER, G.L.- 1973 a.- Epidemiological and clinical relevance of the Dane and subtypes of Australia antigen among patients and healthy carriers. Digestion.8:436.
- NIELSEN, J.O., NIELSSEN, M.H., ELLING, P.-1973 b.- Differential distribution of Australia antigen associated particles in patients liver diseases normal carriers. New.Engl.J.Med. 288:484.
- NIELSEN, J.O., LE BOUVIER, G.L.,- 1973 c.- Copenhagen hepatitis acute program: Subtypes of Australia antigen among patients and healthy carriers in Copenhagen. New.Engl.J.Med. 289:377-378.
- NIELSEN, J.O., REINICKE, V., DIETRICHSON, O.,-1973 d.-Immunological studies of Australia antigen with and without liver diseases. Clin. Fap. Immunol. 15:9-16.

NORDENFELT, E., KJELLEN, L.,-1969.- Presence and persistence of Australia antigen in a Swedish hepatitis series. Acta Path. Microbiol. Scand. 77:489.

NORTH, M.L., KANDEL, G., MALGRAS, J.-1972.- Antigen et anti-corps des hepatitis a virus. Leur recherche chez les donneurs de sang y chez les malades. J.Med. Strasbourg. 3:415-423.

NOTKINS, A.L.- 1974.- Immune mechanisms by which the spread of viral infections is stopped. Cell. Immunol. 11:478-483.

NOWOSLAWSKI, A., BRZOSKO, W.J., MADALINSKI, K., KRAWEZYUSKI, K.- 1970.- Cellular localization of Australia antigen in the liver of patients with linfoproliferative disorder. Lancet I:494.

NOWOSLAWSKI, A., SWIDERSKA, H., MADALINSKI, K., KRAWEZYUSKI, K.- BRZOSKO, W.J.- 1971 a.- Inflammatory effect of Australia antigen-antibody immune complexes. Lancet I:598.

NOWOSLAWSKI, A., KRAWEZYUSKI, K., BRZOSKO, W.J., MADALINSKI, K.- 1971 b.- Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. Am.J.Pathol. 68:31-57.

NYDEGEER, U.E., LAMBERT, P.H., GERBER, H., MIESCHER, P.A.- - 1974.- Circulations immune-complexes in the serum in systemic Lupus Erythematosus and in carriers of Hepatitis B antigen. - Quantitation by binding to radiolabeled C 1 q. J.Clin.Invest. 54:297-309.

OGRA, P.L.- 1973.- Immunologic aspects of hepatitis associated antigen and antibody in human body fluids. J. Immunol. - 110:1197-1205.

OKOCHI, K., MURAKAMI, S.- 1968.- Observations on Australia antigen in Japanese. Vox San. 15:374:385.

OLDSTONE, M.B.A., DIXON, F.J.- 1969.- Pathogenesis of chronic disease associate with persistent lymphocytic choriomeningitis viral infection. J.Exp.Med. 129:483.

OLDSTONE, M.B.A., DIXON, F.J.- 1971.- Immune complex disease on chronic viral infections. J.Exp.Med. 131:32-40.

OLIBAYASHI, A., MAYUMI, M. OKOCHI, A.- 1971.- Australia antigen in familial cirrohsis. Lancet 1:244.

O.M.S.- 1970.- Viral hepatitis and tests for the Australia (Hepatitis-associated) antigen and antibody. Bull. Wld.Org. 42:957-992.

- ORCEL, L., ANTOINE, H.M., SMADJA, A.- 1972.- Pathological - findings in viral hepatitis. Amer. J.Dis.Chil. 123:303-309.
- PALACIOS, J.M. PATO, I., SALMERON DE DIEGO, J., GARCIA ROBLES, R., MORENO, B. LORENTE, L.- 1972.- Antígeno Australia en líquido amniótico. Rev.Clin.Esp. 126:537-539.
- PAPADOPOULOS, N.M., TRAIANOS, G.P., THONAKOS, A.P., TINIAKOS, G.- 1973.- Biochemical findings compared with histologic observations in carriers of hepatitis B antigen. Proc. Soc. Exp, Biol. Med. 143:323-325.
- PANOUSE-PERRIN, J., RACHMAN, F., COUROUCE, A.; DUPRING, J.M.- 1973.- Culture of hepatitis B virus on a human cell line of - hepatic origin (preliminary results). Biomedecine 19:442-446.
- PAEVEVANGELOU, G., TRICHOPOULOS, D., KREMASTINOUT, T., PAPOUTSAKIS, G.- 1974.- Prevalence of hepatitis B antigen and antibody in prostitutes. Br. Med. J. 2:256-258.
- PATTISON, C.P. MAYNARD, J.E., BERQUIST, K.R., WEBSTER, H.M.- 1973.- Serological and peridemiological studies of hepatitis B in haemodialysis units. Lancet 2:172-174.
- PETTIGREW, N.M., GOUDIE, R.B, RUSELL, R.I., CHAUDHURI, A.K.R.- 1972.- Evidence for a role of hepatitis virus B in chronic alcoholic liver disease, Lancet. 2:724-725.
- POLAKOFF, S., COSSART, Y.E., TILLET, H.E.- 1972.- Hepatitis in dialysis units in the United Kingdom. Br.Med.J. 3:94-99.
- POSTON, R.N.- 1974.- A buffered chronic choride method of attaching antigens to red cells: Use in haemagglutination. J. Immunol. Methods 5:91-96.
- POZUELO GONZALEZ, A.- 1973.- Antígeno Australia. Hospital General XIII:333-340.
- PRINCE, A.M.- 1968 a.- An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. Proc.Natl.Acad. Sc. USA 60:814-821.
- PRINCE, A.M.- 1968 b.- Relation of Australia and SH antigens. Lancet 2:462-463.
- PRINCE, A.M.- 1969.- Immunologic distinction between I.H. - and SH. New Engl. J.Med. 281:163-164.
- PRINCE, A.M., HARGROVE, R.L, JEFFRIES, G.H.) 1969.- The role of serum hepatitis virus in chronic liver disease. Trans.Assoc. Am.Phys. 82:265.

- PRINCE, A.M., BURKE, K.- 1970.- Serum hepatitis antigen (SH) Rapid detection by high voltage immunoelectroosmoforesis. -- Science 1969:593-595.
- PRINCE, A.M.- HARGROVE, R.L, SZMUNESS, W., CHERUBIN, C.E.- FONTANA, V.J., JEFFRIES, G.H.-1970.- Immunologic distinction between infectious and serum hepatitis. New. Engl.J.Med. 282: 987-991.
- PRINCE, A.M., TREPO, C.- 1971.- Role of immune complexes -- involving SH antigen in pathogenesis of chronic active hepatitis and polyarteritis nodosa. Lancet 1:1309-1312.
- PRINCE, A.M., SZMUNESS, W., WOODS, K.R., GRADY, G.F.- 1971.- Antibody against serum hepatitis antigen. Prevalence and potential use as immune serum globulin in prevention of serum hepatitis infections. New.Engl.J.Med. 285:933-937.
- PRINCE, A.M., METSELAAR, D., KAFUKO, G.W., MUKWAYA, L.G., LING, P.M. OVERBY, L.R.- 1972 a.- Hepatitis B antigen in wild-caught mosquitoes in Africa. Lancet 2:247-250.
- PRINCE, A.M., BROTMAN, B., CHERUBIN, C.E.- 1972 b.- Immune response in patients who received blood containing serum hepatitis antigen. Amer.J.Dis.Chil. 123:415-418.
- PRINCE, A.M.-, BROTMAN, B., GRADY, T.F., KUHN, W.J., HAZZI, C., LEVINE, R.W., MILLIAN, S.J.- 1974.- Long incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis B virus. Lancet 2:241-246.
- PROPERT, S.A.- 1938.- Hepatitis after prophylactic serum. Br. Med.J.. 2:677-
- RAO, K.H., VYAS, G.N.,- 1973.- Hepatitis B antigen activity in protein subunits produced by sonication. Nature New.Biol. 241:240-241.
- RAYON, J.M., MARTI, M.L., RODRIGO MORENO, M., BERENQUER, J., SANCHEZ CUENCA, J.M. SERRA, M., GONZALEZ MOLINA, A., BAGUENA, J.- 1973.- Afectación hepática en donantes de sangre portadores de antígeno Australia. III- Hallazgos histológicos en 38 casos. Med.Clin. 61:612-615.
- REED, W.D., EDDLESTON, A.L.W.F., STERN, R.F., WILLIAMS, R., ZUCKERMAN, A.J., BOWES, A., EARL, P.M.- 1973 a;} Detection of hepatitis B antigen by radioimmunoassay in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma in Great Britain. Lancet 2-690-694.
- REED, W.D., MITCHELL, C.G., EDDLESTON, A.L.W.F., LEE, W.M., WILLIAMS, R.- 1974.- Exposure and immunity to hepatitis B virus in a liver unit. Lancet 1:581-583.

- REESINK, H.W., DUIMEL, W.J., BRUMMELHUIS, H.G.J.- 1973.- Evaluation of a new haemagglutination technique for the demonstration of hepatitis B antigen. Lancet 2:1351-1353.
- REINICKE, V., DYBKJAER, E., POULSEN, H., BANKE, O., LYLLOFF, K., NORDENFIELD, E.,-1972.- Transmission of hepatitis: Role of liver disease in Australia antigen positive donors. New. Engl.J.Med. 286:867-870.
- RICCI, G., DE BAC, C., TURBIESSI, G., CARAMIA, F.,-1973.- Intranuclear virus like particles and cytoplasmic HB antigen - in chronic hepatitis. New.Engl.J.Med. 289:1144-1145.
- RICH, A.R., LEWIS, M.R.,- 1928.- Mechanisms of allergy in tuberculosis. Proc. Soc. Expt. Biol.(N.Y.) 25:596.
- RICHER, G., HOULE, G., VIAILLET, A., TURGEON, F., GUEVIN, R.- 1974.- Antibodies against coat HB antigen. Lancet 1:356.
- RIGOLI, M.H.- HEER, E., WEILZ, G.- 1971.- Coincidental Australia antigen and antibody. INew.Engl.J.Med. 285:525.
- ROCKLIN, R.E., MEYERS, O.N., DAVID, J.R.- 1970.- An in vitro assay for cellular hypersensitivity in man. J.Immunol. 104:95.
- RODRIGO, M., SERRA, M., GAIRRIDO, G., SANCHEZ CUENCA, J.M.,) BERENQUER, J., BAGUENA, J.- 1971 a.- Antígeno Australia (HAA) en las hepatopatías agudas y crónicas. Med.Esp. 66:169-176.
- RODRIGO, M., SERRA, M., MARTI, N.L., BERENQUER, J., SANCHEZ CUENCA, J.M., GARRIDO, G. IBAGUENA, J.,-1971 b.- Antígeno Australia (HAA) en donantes de sangre. Med.Esp. 66:87-90
- RODRIGO, M., MARTI, M.L., SERRA, M., SANCHEZ CUENCA, J.M. - RAYON, M.M., GONZALEZ MOLINA, A., BERENQUER, J. BAGUENA, J.- 1973.- Afectación hepática en donantes de sangre portadores de antígeno Australia. I: Estudio clínico patológico e inmunológico en 38 casos.Rev.Clin.Esp.
- RODRIGUEZ,-AGULLO, J.L.- 1971.-Antígeno Australiano (SH) en las hepatopatías. Rev.Clin. Esp. 123:261-266.
- ROSENBERG, J.L., JONES, D.P., LIPITZ, L.R., KIRSNER, K.B.- 1973.- Viral hepatitis: An occupational hazard to surgeons. J.A.M.A. 223:395-400.
- RUBIN, E., LIEBER, C.S.- 1974.- Fatty liver, alcoholic hepatitis and cirrhosis produced by alcohol in primates. New. Engl. J.Med. 290:128-135.
- SABESIN, S.H.- KOFF, R.S.- 1974.- Pathogenesis of experimental viral hepatitis(I).New Engl.J.Med. 290:944-950.

- SABESIN, S.M., KOFF, R.S.- 1974.- Pathogenesis of experimental viral hepatitis (II).- New.Engl.J.Med. 290:996-1001.
- SANCHEZ CUENCA, J.M., SERRA, M., RODRIGO, M., MARTY, M.C.- GONZALEZ MOLINA, A., RAYON, J.M., BAGUENA, J.- 1973.- Afectación hepática en donantes de sangre portadores de Antígeno - Australia. II: Localización intrahepática del AAH por inmunofluorescencia. Allerg. Immunol. Pathol. 1:259-268.
- SANDERS, C.V., LADY, J.P., SANDFORD, J.P., HULL, A.R.- 1971.- Suppression of interferon response in lymphocytes from patients with uremia. L.Lab.Clin.Med. 77:768-776.
- SCHWEITZER, I.L., DUNN, A.E.G., PETERS, R.L., SPREARS, R.L.- 1973.- Viral hepatitis in neonates and infants. Amer.J.Med. 55:762-761.
- SSENYK, G., WILLIAMS, E.B., MITECKI, D.E., GOODMAN, J.W.-1971.- The functional dissection of an antigen molecule: Specificity of humoral and cellular immune responses to glucagon. J.Exp. Med. 133:1294.
- SERPEAU, D., MANNONI, P., DHUMEAUX, D., BERTHELOT, P., 1971.- Hepatitis-associated-antigen in human bile. Lancet 221966.
- SERRANO GONZALEZ-SOLARES, en PERIANES CARRO, J., ORTIZ MASLLORENS, F., SERRANO-GONZALEZ SOLARES, J., HERNANDEZ GUIO, C., CALLEJA CANELAS, - 1972.- Antígeno Australia. Bol. Fund. J. -- Díaz. IV:199-218.
- SHERLOCK, S., FOX, R.A., NIAZI, S.P., SCHUER, P.J.- 1970.- - Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated (Australia) antigen in serum. Lancet 1-1243-1247.
- SHERLOCK, S.,-1971.- Disease of the liver and biliary system Pág. 416 Oxford.
- SHULMAN, N.R., BARKER, L.F.- 1969.- Virus like antigen, antibody and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation.Science 165:304-306.
- SHULMAN, N.R.-1970.- Hepatitis-associated-antigen. Amer.J.Med. 49:669-692.
- SHULMAN, N.R.,HIRCHMANN, R.J., BARKER, S.L.- 1970.- Viral hepatitis. Ann. Inter.Med. 72:257.269.
- SHWE, T., ZUCKERMAN, A.J.- 1972.- Australia antigen and antibody in British patients with leprosy, J.Clin.Pathol.25:401-402.

- SJOGREN, H.O., HELLSTROM, I., BANSAL, S.T., HELLSTROM, K.E. 1971.-Suggestive evidence that the "Blocking antibodies" of tumour-bearing individuals may be antigen-antibody complexes. Proc.Natl.Acad.Sc.USA 68:1372-1375.
- SOBORG, M., BENDIXEN, G.,--1967.- Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitibility. Acta Med.Scand. 181: 247-256.
- SOULIER, J.P., BATIX, C., COUROUCE, A.M., BENAMON, D., AMMONCH, P., DRONET, L.- 1972.-Prevention of hepatitis B (SH Hepatitis). Amer.J.Dis.Chil. 123:429-434.
- SPITLER, L., BENJAMIN, E., YOUNG, J.D., KAPLAN, H., FUDEN--BERG, H.H.- 1970.- Studies on the immune response to a characterized antigenic determinant of the tobacco mosaic virus protein. J.Exp. Med. 131:133-148.
- STEELE, R.W., HENSEN, S.A., VINCENT, M.M., FUCCILLO, D.A., - BELLANTI, J.A.- 1973.- A Cr⁵¹ microassay technique for cell-mediated immunity to viruses. J.Immunol. 110:1502-1510.
- STOLOFF, I.L., STOUT, R., MIERSON, R.M., HAVENS, W.P.-1958.- Production of antibody in patients with uremia. New.Engl.J. Med. 259:320-323.
- SUTNICK, A.I., LONDON, W.T., GERSTLEY, B.J.S.-GROULUND, M.M.-y BLUMBERG, B.S.- 1968.- Anicteric hepatitis associated with Australia antigen; occurrence in patients with Down's syndrome. J.A.M.A. 205:670-674.
- SUTNICK, A.I., LONDON, W.T., BLUMBERG, B.S., YANKEE, R.A., -- GERSTLEY, B.J.-y MILLMAN, I.,-1970 a.- Australia antigen (a hepatitis associated antigen) in leukaemia. J.Natl.Cancer Inst. 44:1241-1249.
- SUTNICK, A.I., LONDON, W.T., MILLMAN, I., COYNE, V.E., BLUMBERG, B.S.- 1970.b.- Viral hepatitis revised concepts as a result of the study of Australia antigen. Med.Clin.N.Amer. - 54:805.
- SUTNICK, A.I., MILLMAN, I., LONDON, W.T., BLUMBERG, B.S.- -- 1972 a.- Australia antigen. Ann.Rev.Med. 23:161-176.
- SUTNICK, A.I., LONDON, W.T., BLUMBERG, B.S., VIERRUCCI, A.- 1972 b.- *AUstralia antigen posttransfusion hepatitis and the chronic carrier state. Amer.J.Dis.Chil. 123:392-400.
- TAYLOR, P.E.- 1972.- Laboratory test for Australia (Hepatitis-associated) antigen and antibody. Br.Med.Bull. 28:138-141.
- TELATOR, H., KAYHAN, B., KES, S. KARACADAG, S.- 1974.- HB antigen in sweat. Lancet 2:461.

- THOR, D.E., JUREZIG, R.E., VEACH, S.R., MILLER, E., DZAY, S. 1968.- Cell migration inhibition factor released by antigen from human peripheral lymphocytes. *Nature*. 219:755-757.
- TREPO, C.G., THIVOLET, J., PRINCE, A.M.- 1972.- Australia antigen and polyarteritis nodosa. *Amer.J.Dis.Chil.* 123:390-391.
- TRIPATZIS, I., HORST, H.G.,-1971.- Detection of Australia - SH-antigen in mice. *Nature*. (*New Biol.* 231:266-267.
- ULSTRUP, J.C., FIGENSCHOUK, K.J.,-1972.- Frequency of hepatitis B infection. *Lancet* 2:1035.
- U.S.N.C.D.C.- 1969.- Hepatitis surveillance report n°30 - pág. 15. United States National Communicable Diseases Center. Atlanta. Georgia.
- VAN WAES, I., SEGERS, J., VAN EYMOND, J., VAN NIMMEN, L., -- BARBIER, F., WIEME, R., DEMEULENAERE, L.-1974.- Chronic liver disease and hepatitis B antigen: A prospective study. *Br. Med J.* 3:444-446.
- VIERRUCHI, A., BIANCHINI, A.M. BORGESSE, G., BAGNOLI, F., MESSINA, G.-1968.- L'antigen Australia: I rapporti con l'epatite infettiva e da siero. *Pediatria Internazionale* 18, 4.
- VITAL, S.B., THOMAS, W., CLOWDUS, B.F.- 1973.- Acute viral hepatitis course and incidence of progression to chronic hepatitis. *Amer.J.Med.* 55:757.761.
- VYAS, G.N., FUDENBERG, H.A., PRETTY, H.M., GOLD, E.R.-1968.- A new rapid method for genetic typing of human immunoglobulins. *J.Immunol.* 100:274-279.
- VYAS, G.N., SHULMAN, N.R.,-1970.- Haemagglutination assay - for antigen and antibody associated with viral hepatitis. - *Science* 170:332-333.
- VYAS, G.N., WILLIAMS, E.W., KLAUS, G.G.B., BOND, H.E.-1972a)- Hepatitis-associated-Australia antigen. Protein, peptides, - and amino acid composition of purified antigen with its use in determining sensitivity of the haemagglutination test. - *J.Immunol.* 108-1114-1118.
- VYAS, G.N., RAO, K.R., IBRAHIM, A.B.- 1972 b.- Australia antigen (hepatitis B antigen): A conformational antigen dependent on disulfide bonds. *Science* 178:1300-1301.
- WALLACE, J.- 1972.- Total screening of blood donations for Australia (hepatitis associated) Antigen and its antibody. *J.Clin.Path.* 25:553.
- WAASH, J.H., YALLOW, R.S., BERSON, S.A.,-1970 a.- Detection of Australia antigen and antibody by means of radioimmuno-- assay techniques. *J.Inf.Dis.* 121:550-554.

WALSH, J.H., PURCELL, R.H. & MORROW, A.G., CHANOCK, R.M.-
SCHMIDT, D.T., 1970 b.- Posttransfusion hepatitis after
open-heart operations. J.A.M.A. 211:261-265.

WARD, R., BORCHERT, P., WRIGHT, A., KLINE, E.-1972.- Hepa-
titis B antigen in saliva and mouth washings. Lancet 2:726-
727.

WATSON, B., LANGLEY, D.J., CHRYSTIE, I.L.- ISLAM, M.N., BER-
TRAND, J., BANATVALA, J.E.- 1973.- Hepatitis B antigen and
safety in pathology laboratories. Lancet 1:985-987.

WESTWOOD, J.C., CHAUDHARY, R.K., PERRY, E.,-1973.- Short-term
inapparent infection after accidental ingestion of hepatitis
B positive serum. Lancet 2:1395-

WEWALKA, F.G.,-1972.- Protracted and recurrent forms of --
viral hepatitis. Amer.J.Dis.Chil. 123:283-286.

WHO Expert Committee on Hepatitis. 1964.- Second Repoert.
Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Serv. 285-3.

WILSON, W.F., KIRKPATRICK, C.H., TALMAGE, D.W.,-1965.- Supres-
sion of immunology responsiveness in uremia. Ann. Intern.Med.
62:1-14.

WIKTOR, T.J., KUWERT, E., KOPROWSKI, H.-1968.- Immune lysis
of rabies virus-infected cells. J.Immunol.101:1271.

WRIGHT, R. MC COLLUM, R.W., LATSKIN, G.,-1969.- Australia an-
tigen in acute and chronic liver disease.Lancet 2:117-

ZUCKERMAN, A.J.,-1969.- Viral hepatitis and the Australia SH
antigen. Nature 223:569-572.

ZUCKERMAN, A.J.-BAINES, P.M., ALMEIDA, J.B.-1972.- Australia
antigen as a marker of propagation of serum hepatitis virus
in liver culture. Nature 236:78-81.

ZUCKERMAN, A.J.,-1973.- Australia antigen. Arch. Fr.Mal.App.
Dig. 62:160-162.