

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA-LABORATORIO CLINICO



**INCIDENCIA DE ANTIGENO AUSTRALIANO
EN DONANTES PROFESIONALES DEL
INSTITUTO SALVADOREÑO DEL SEGURO
SOCIAL, UTILIZANDO LA TECNICA DE
RADIOINMUNOENSAYO HEPRIA B**

SEMINARIO DE GRADUACION

PRESENTADO POR

**ANA MARGARITA ACEVEDO VASQUEZ
MIRIAM EDITA RAMIREZ LANDAVERDE
YOLANDA AIDA MONTES DIAZ**

PREVIA A LA OPCION DEL TITULO DE:
LICENCIADO EN LABORATORIO CLINICO

JUNIO DE 1985

SAN SALVADOR,

EL SALVADOR,

CENTRO AMERICA.



T
616.07561
A1742

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10105315

INCIDENCIA DE ANTIGENO AUSTRALIANO EN DONANTES
PROFESIONALES DEL INSTITUTO SALVADOREÑO DEL
SEGURO SOCIAL, UTILIZANDO LA TECNICA
DEL RADIOINMUNOENSAYO HEPRIA B

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGIA MEDICA-LABORATORIO CLINICO

INCIDENCIA DE ANTIGENO AUSTRALIANO EN DONANTES PROFESIONALES
DEL INSTITUTO SALVADOREÑO DEL SEGURO SOCIAL, UTILIZANDO LA
TECNICA DEL RADIOINMUNOENSAYO HEPRIA B

POR

ANA MARGARITA ACEVEDO VASQUEZ
MIRIAM EDITA RAMIREZ LANDAVERDE
YOLANDA AIDA MONTES DIAZ

Seminario presentado ante el Jurado Calificador de la
Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de El
Salvador, en satisfacción parcial de los requerimientos
previos a la obtención del Título de Licenciado en Labo-
ratorio Clínico.

Lic. Guadalupe de Barahona
Asesor

JUNIO 1985

SAN SALVADOR

EL SALVADOR

CENTRO AMERICA

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso.

Al Instituto Salvadoreño del Seguro Social, por proporcionar_unos el material necesario para la elaboración de este trabajo.

A nuestro Asesor, Lic. Guadalupe Hidalgo de Barahona, por su valiosa colaboración y orientación.

Al Dr. Rómulo Sosa, que con su eficiente y desinteresada ayuda hizo posible la elaboración de este trabajo. Por su excelente calidad humana y aporte de sus conocimientos.

Al Dr. Carlos Flores Menéndez, de manera muy especial, por su acertada orientación.

Al personal del Banco de Sangre del ISSS.

A todas las personas que en una u otra forma nos ayudaron a realizar este trabajo.

DEDICATORIA

A DIOS TODOPODEROSO : Por su iluminación.

A MIS PADRES : MARIA ANDREA (Q.D.D.G.)
ISMAEL
Por todo su sacrificio.

A MI HIJA : KATTIA MARGARITA
Por ser la causa de mi superación

A MI HERMANA : ANA MARIA
Por su cariño y comprensión.

A ENRIQUE, ISMAEL ENRIQUE, NADIA Y A TODAS AQUELLAS
PERSONAS QUE COMPARTIERON MIS PENAS Y ALEGRÍAS.

ANA MARGARITA ACEVEDO

DEDICATORIA

- A DIOS TODOPODEROSO : Por haberme permitido realizar mis aspiraciones.
- A MI MADRE : MARTHA YOLANDA DIAZ TRUJILLO: Mi eterno agradecimiento por su amor, guía y abnegación en la coronación de mi carrera.
- A MI ABUELITA : LEONOR TRUJILLO v. DE DIAZ: Que con su fortaleza y cariño ayudó a forjarme mi destino.
- A MI ESPOSO : LIC. MANUEL FERNANDO HERRERA: Con profundo amor y cariño.
- A MIS ADORADOS HIJOS: JORGE MANUEL y MARIA ALEJANDRA: Con todo mi amor.
- A MIS HERMANAS : NORA SYLVIA
ANABELLA ELIZABETH
MARLENE LEONOR
GINA ESMERALDA
Con fraternal cariño.
- A MIS FAMILIARES : Con afecto y cariño.

YOLANDA AIDA MONTES DIAZ

I N D I C E

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Materiales y Métodos	14
IV. Resultados	27
V. Discusión	31
VI. Recomendaciones	37
VII. Bibliografía	38

I. RESUMEN

Con el objeto de establecer la prevalencia del antígeno australiano en la sangre de donantes profesionales considerados sanos que donan su sangre al Instituto Salvadoreño del Seguro Social, se procesaron 1121 muestras de sueros utilizando la técnica de Radioinmunoensayo (RIA) Hepria B.

Se obtuvo una positividad del 1.4% y un 98.6% de negatividad, este porcentaje nos indica que en nuestro medio la hepatitis post transfusional representa un problema realmente serio.

Encontramos que el método RIA Hepria B es una prueba práctica, sencilla y específica, recomendándola como un método básico de rutina para la investigación del AgsHB en la sangre de los donadores que donan este producto biológico a los bancos de sangre. De esta forma el rechazo de estos donadores reduciría la transmisión parenteral del agente de hepatitis B, en el uso de la hemoterapia.

II. INTRODUCCION

La hepatitis sérica fue descrita por primera vez en 1883, a raíz de la aparición de ictericia en un grupo de trabajadores navales, a quienes se les había inoculado vacuna antivariólica utilizando linfa glicerizada de origen humano (3,35). Sin embargo el término ictericia epidémica era ya conocido por Hipócrates y los antiguos escritores griegos y romanos cuando en tiempos de guerra se producían grandes epidemias a las que se les daba el nombre de ictericia de campaña, que no sólo afectaba la estrategia militar y el curso de la guerra, sino también a la población civil (1).

No fue sino hasta 1967-1968, que se descubrió en el laboratorio un ente específico para una de las formas de la hepatitis, la de tipo B que produce hepatitis sérica. Esta hepatitis puede ser transmitida por contacto íntimo sexual (6), por la ingesta oral de materiales contaminados y por vía parenteral, habiendo sido esto demostrado por Krugman y colaboradores (4,6). Hasta entonces no se había progresado mucho en los conocimientos sobre la hepatitis vírica. Sin embargo, cinco años más tarde se descubrió el virus de la hepatitis A, que provoca la hepatitis infecciosa. La adquisición usual de este virus es por vía oral por medio de las heces provenientes de un enfermo, que podrían contami-

nar el agua potable, alimentos, etc. Además se han reportado algunos casos que han sido transmitidos por transfusión de sangre o sus derivados ya que durante el período de incubación, en la fase aguda y en la convalecencia se producen viremias (1,9). Recientemente se ha sugerido la existencia de otros agentes virales causantes de hepatitis, a esta tercera forma de afección se le conoce como hepatitis no A no B (19). Por exclusión, los casos que no son causados por el VHB, VHA, han sido clasificados como no A no B. (19). Se considera actualmente que el 35% de las hepatitis virales post-transfusionales son debidas a los virus no A no B (11)

Como se ha descrito anteriormente, una de las formas de transmisión de hepatitis viral (A, B, o no A no B) es por medio de transfusiones sanguíneas. Debido a las consecuencias serias que implica el padecimiento de hepatitis viral se desencadenó la búsqueda de una prueba de laboratorio que pudiera evidenciar el peligro de emplear como donador de sangre a un posible portador de uno de estos agentes virales. El primer paso en este sentido se dió cuando Blummburg y colaboradores en 1964 (4) descubrieran en la sangre de un aborigen australiano que había padecido hepatitis la presencia de un antígeno que no se encontraba en la sangre de personas que no habían sufrido esta afección. Estos autores concluyeron de que el antígeno observado era

de origen patológico y que la partícula detectada podía perfectamente ser el virus de la hepatitis epidémica. Como este antígeno se observó por primera vez en un aborigen de Australia, recibió el nombre de antígeno australiano. Con el descubrimiento del antígeno australiano y la demostración posterior de que estaba definitivamente asociado con la hepatitis viral, se comenzó una nueva era de investigación de las enfermedades hepáticas (4,9,14,34). Bekeris et al menciona (3) que Prince y Giles establecieron la asociación específica del antígeno australiano con la hepatitis sérica. Como resultado de estas investigaciones en los últimos años se han desarrollado diversos métodos de laboratorio utilizados para detectar el AgsHB (19,26). Entre los métodos más conocidos para detectar el AgsHB podemos mencionar la fijación de complemento, Contraelectroforesis Cruzada, Inmunodifusión, Radioinmunoensayo, Enzime-Linked Immunosorbent Assay o Test de ELISA. Además existen otros marcadores antígenos que identifican al virus de la hepatitis B. Uno de estos es el antígeno "core" de la hepatitis B. Los anticuerpos contra este antígeno aparecen tempranamente durante la infección aguda por lo que la IgM anti HBC puede ser detectada antes que los anticuerpos contra el AgsHB, que se desarrollan durante la convalecencia y recuperación de la hepatitis B. Sin embargo, la búsqueda de estos anticuerpos no se usan como de rutina en los ban-

cos de sangre.

Con el uso de estos procedimientos de laboratorio se ha reportado una mayor incidencia de positividad de antígeno australiano (Ag_sHB) en personas asintomáticas, reclusas en cárceles, destacamento militar, en pacientes con síndrome de Down que viven por largo tiempo en instituciones hospitalarias, en pacientes con leucemias, aplasia medular o enfermedades oncológicas en donde se usa mucho la hemoterapia (sangre total o derivados), en Lepra Lepromatosa, en sujetos con insuficiencia renal crónica sometidos a Hemodiálisis, en pacientes que reciben terapia inmunosupresora y sobre todo en personas que presentan hepatitis viral B en la fase aguda. En algunos países los riesgos de adquirir la hepatitis B pueden acentuarse a causa de las prácticas tradicionales de tatuajes, escarificaciones, sangrías, circuncisiones rituales y las picaduras repetidas de insectos chupadores de sangre (1) así como también entre los drogadictos y en los casos de inoculación accidental con agujas y objetos cortopunzantes contaminados (1).

Se ha reportado además que durante el período de desarrollo del feto, las mujeres embarazadas que son portadoras del virus de hepatitis B pueden transmitir el virus a sus hijos desde este período y tener un número de niños

que son infectados in útero.

Tomando en cuenta que en la población general a cualquier edad por cada caso de hepatitis aguda con ictericia se producen diez casos subclínicos anictéricos (1,34), se explica porqué mucho portador de antígeno australiano desconoce si han padecido la enfermedad aguda.

Clínicamente la hepatitis B se diagnostica sobre la base de una infección producida alrededor de 60 a 80 días después de una transfusión de sangre total, plasma o de sus diferentes fracciones o por inoculación accidental con material contaminado al utilizar agujas o jeringuillas contaminadas. Sin embargo hay pruebas suficientes de la transmisión de la hepatitis B por contacto sexual y por vía bucal encontrándose además el antígeno de la superficie de la hepatitis B en distintos humores corporales como la saliva, las descargas menstruales, vaginales y el fluido seminal, considerándose todos ellos como vehículos transmisores de la infección (1).

La infección con hepatitis B es el resultado de la introducción del virus de la hepatitis B en el torrente sanguíneo. Al circular la sangre que contiene el virus B (VHB), a través del hígado el virus infecta los hepatoci-

tos, dentro del hepatocito del virus se reproduce y es expulsado al torrente sanguíneo para circular en éste y finalmente reinfectar más células hepáticas (ver figura en página 12).

Cuando el virus de hepatitis B invade el hepatocito las células replican al virus, sin embargo se produce un exceso de la proteína del capsido que no se acompaña del genoma viral (31). Tanto el virus como el exceso de proteína del capsido pasan a la circulación. La partícula completa es la infecciosa y es conocida como la partícula de "DANE", el exceso de proteína cobertora aparece en la circulación como capsido vacío. La proteína cobertora de la partícula de "DANE" y las capsides vacías posee ambas el antígeno conocido como antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB) pero únicamente la partícula de "DANE" es la infecciosa (ver figura en página 13). Al circular el AgsHB en el plasma, el sistema inmune del cuerpo reconoce el antígeno como extraño y produce anticuerpos anti-AgsHB el cual reacciona con la partícula de DANE y con el AgsHB. En parte la recuperación de la enfermedad tiene lugar en cuanto suficientes anticuerpos son producidos para destruir el virus. Pero sin embargo, la recuperación clínica usualmente no significa erradicación total del virus. De estos pacientes con hepatitis B aguda, algunos pueden

quedar con hepatitis crónica sintomática; otros que son la mayoría, se recuperan totalmente y son asintomáticos, pero siempre todos serán portadores del AgsHB.

La existencia de la hepatitis crónica subclínica se puede demostrar por la presencia del antígeno asociado con la hepatitis B en 200 millones de portadores asintomáticos en todo el mundo (11,14,21). Definiremos como "portadores" a los individuos en cuya sangre se albergan o detectan el virus de hepatitis B, después de seis meses de haber tenido los síntomas agudos de la enfermedad; los que actúan como propagadores de la misma hasta por 20 años, o más. Según los estudios realizados en otros países, los portadores se observan con más frecuencia entre los hombres que entre las mujeres y esto está en relación a los hábitos y costumbres de los habitantes de dichos países (1). La prevalencia del antígeno australiano en la población en general varía en diferentes zonas o países de la tierra:

% INCIDENCIA	ZONAS
0.1%	Europa Septentrional, América del Norte y Australia (1).
2 a 5%	Europa Central y Oriental (3).
Mayor de 5%	Europa Meridional, países del Mediterráneo, América Central y Sur (31).
Mayor de 20%	Africa-Asia y las regiones del Pacífico (34).

En El Salvador, el único trabajo en esta materia es el de Maestre et al (24) donde se utiliza el método de contraelectroforesis cruzada en gel agar para detectar el AgsHB. Estos autores encontraron 2.7% de portadores en los donantes profesionales del Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

Con toda la evidencia de la relación entre el AgsHB y la hepatitis, la Asociación Americana de Bancos de Sangre estableció en Octubre de 1971, como requisito para toda donación de sangre, la investigación del antígeno asociado a la hepatitis B o AgsHB.

No se puede exagerar la importancia de la hepatitis B, la cual es producida por un virus DNA no clasificado (13). La enfermedad en su etapa aguda puede producir distintos grados de gravedad, persistiendo la infección sobre todo en los niños afectados al nacer o durante la primera época de su vida (25,30). La infección de tipo B puede convertirse en una enfermedad crónica que eventualmente puede dar lugar hasta cirrosis. Además, existen pruebas de que hay una íntima relación entre el virus de la hepatitis B y el cancer primario del hígado que es uno de los tumores más frecuentes en el mundo (1,33). En este país, como en otros, no solo se debe de tomar en cuenta

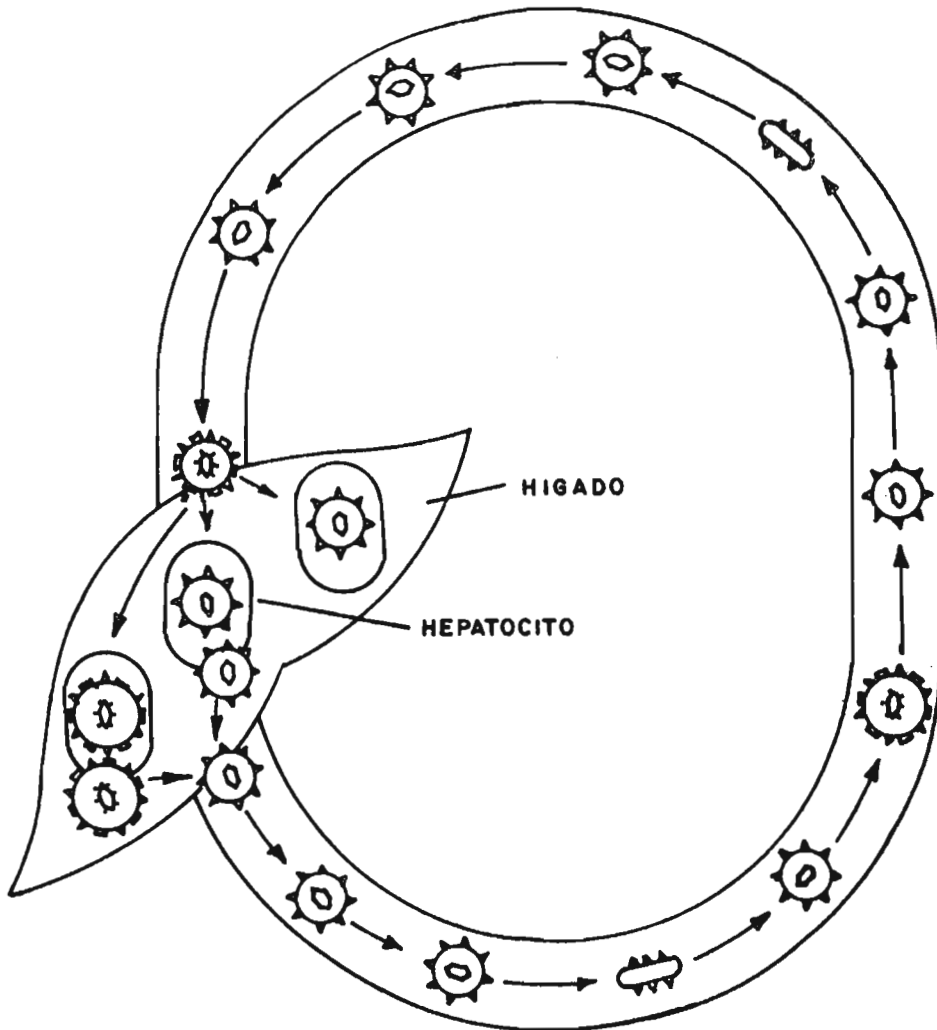
todo lo anterior, sino que debe sumarse el alto costo que tiene que sufragar el Instituto Salvadoreño del Seguro Social por hospitalización, medicamentos, pago de incapacidad y subsidios del enfermo. Lo anteriormente expuesto aunado a que en la actualidad sólo se conoce un trabajo sobre este tema, nos motivó a llevar a cabo la presente investigación en los donantes profesionales del Instituto Salvadoreño del Seguro Social, utilizando para nuestro estudio la técnica del Radioinmunoensayo "Hepria B".*


* RIA INTERNATIONAL INC. 16500 N.M. 15th AVE. MIAMI, FLORIDA,
33169 SUBSIDIARY OF -NABI NORTH AMERICAN BIOLOGICALS INC.

O B J E T I V O S


1. Conocer la prevalencia del antígeno australiano en un grupo de donantes de sangre que donan su sangre al Instituto Salvadoreño del Seguro Social. La prevalencia se determinó por medio de la técnica de RIA "HEPRIA B". En base a estos hallazgos rechazar a todos aquellos posibles donantes que tengan un resultado positivo de antígeno australiano para evitar la transmisión de la hepatitis B por la transfusión.
2. Ensayar la Técnica de RADIOINMUNOENSAYO "Hepria B" en la detección del Antígeno Australiano, como una prueba confiable para poder establecerla como una prueba de rutina en el Laboratorio Clínico del Instituto Salvadoreño del Seguro Social.

VHB INFECCIOSA

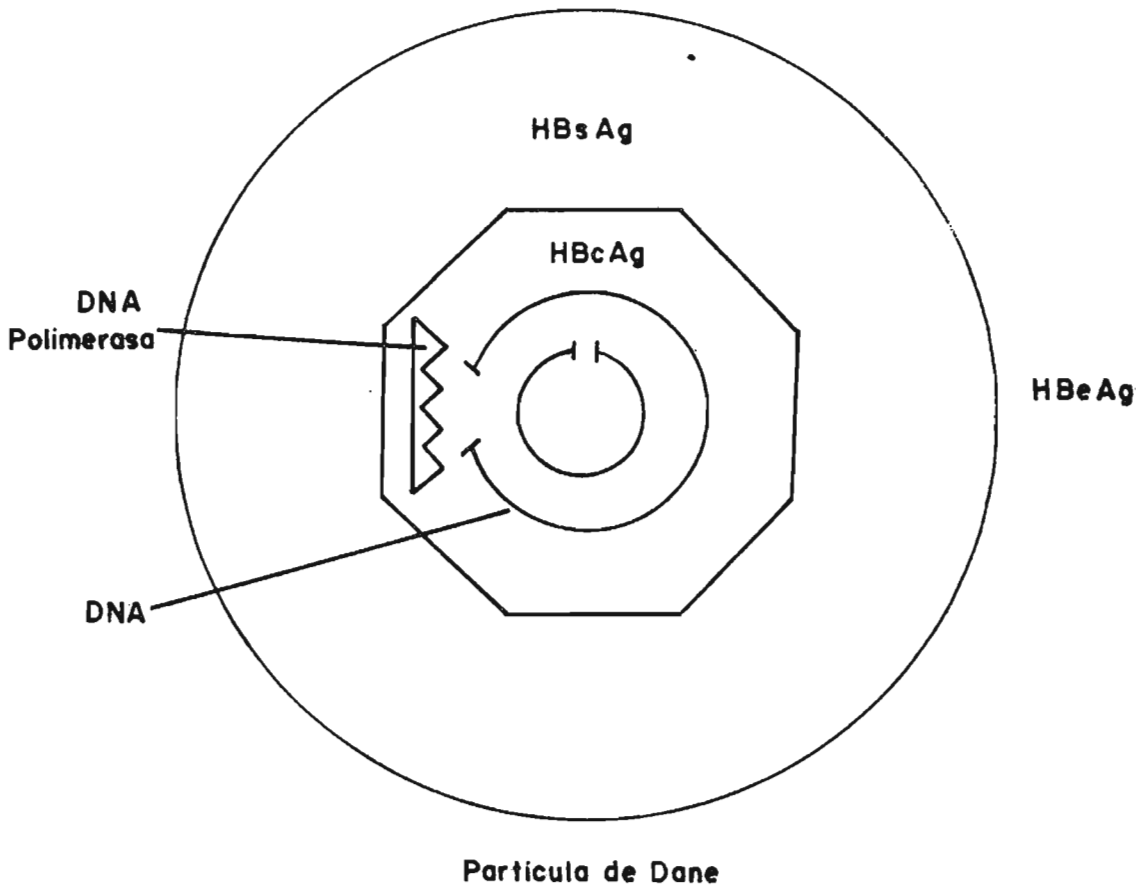


 Capside de forma esférica sin genoma viral (partícula viral vacía).

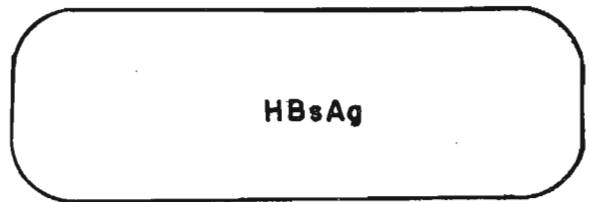
 Partícula de "DANE" con genoma viral.

 Capside de forma tubular sin genoma viral (partícula viral vacía).

Las capsides de cubierta proteica son liberadas en mayor numero que las partículas de DANE.



Esfera



Tubulo

Diagrama de la estructura propuesta del virus de la hepatitis B (HBs Ag = Antígeno de la superficie de la hepatitis B HBc Ag = Antígeno central de hepatitis B).

III. MATERIALES Y METODOS

Población Estudiada.

Este estudio se llevó a cabo en el Instituto Salvadoreño del Seguro Social (ISSS). Se procesaron 1121 muestras de sangre obtenidas de igual número de donantes profesionales considerados sanos. De estos, 1010 pertenecían al sexo masculino y 111 al sexo femenino, todos ellos donaron su sangre en el ISSS. Con el fin de determinar si las personas incluidas en este estudio eran verdaderamente asintomáticas éstas fueron entrevistadas, anotando en una hoja de registro de donadores los siguientes datos: nombre del donante, fecha de nacimiento, sexo, domicilio y los aspectos propios de la enfermedad (se adjunta modelo en página 26).

Colección y Procesamiento de la Muestra.

Las muestras sanguíneas fueron colectadas en ayunas por venopunción, utilizando tubos al vacío sin anticoagulante. Se extrajo aproximadamente 5 mls. de sangre a cada donante, teniendo cuidado de hacer en el sitio de la venopunción una buena asepsia. Con el objeto de disminuir al máximo la posibilidad de obtener datos falsos por una mala muestra. La muestra se colectó con el menor éstasis

sanguíneo para evitar la hemoconcentración y la hemólisis. Las muestras se dejaban coagular a temperatura ambiente, centrifugándose a una velocidad de 1,500 rpm para separar los elementos celulares. El suero se transfirió por simple decantación a un tubo de ensayo limpio, debidamente identificado, teniendo cuidado de eliminar todos aquellos sueros lipémicos y hemolizados. Todas las muestras de suero se guardaron a -20°C hasta el momento de realizar la prueba.

Materiales.

- Sangre sin anticoagulante
- Material para extracción de sangre (agujas descartables para recolección de sangre al vacío 21 x 1 1/2, sostenedor de tubo al vacío, algodón, alcohol).
- Tubo al vacío vacutainer tapón rojo de 10 ml. de capacidad sin anticoagulante.
- Micropipetas de 200 microlitros.
- Puntas descartables para micropipetas de 0 a 500 microlitros.
- Tubos de ensayo de 12 x 75 mm.

- Bandeja de ensayo para procesamiento de muestras.
- Lápiz graso.
- Gradilla metálica.
- Autodispensador de agua desmineralizada.
- Aspirador con fuente de succión.
- Baño María.
- Detector Gamma Centello (Gammacord) I-125.
- Set para análisis cualitativo de Radioinmunoensayo, Hepatitis B, Hepria B.

Método del Radioinmunoensayo (RIA) Hepria B.

Las muestras fueron procesadas por el método Radioinmunoensayo (RIA) Hepria B, que es una prueba de base sólida de tercera generación para el análisis cualitativo del AgsHB en suero o plasma humano.

Reactivos utilizados en la Prueba de RIA Hepria B.

Los reactivos que contiene el Método de Radioinmunoen

sayo Hepria B son los siguientes:

- Tubos que contienen Perlas Plásticas revestidas con los anticuerpos contra el AgsHB.
- Suero control positivo humano que contiene AgsHB, preservado con azida de sodio 0.1%.
- Suero control negativo humano (no contiene AgsHB), preservado con azida de sodio al 0.1%.
- Suero humano con anticuerpos contra AgsHB (anti-HBs) I^{125} .
- Bandejas de reacción con sus respectivas láminas selladas.
- Tubos de ensayo para conteo.

Tanto los reactivos como las muestras deberán estar a temperatura ambiente antes de iniciar la prueba (2).

Principio del Método.

El RIA Hepria B sirve para la identificación del AgsHB en el suero de personas con hepatitis B. El reactivo básico

del SET está constituido por perlas plásticas recubiertas por anticuerpos (antisuero obtenido en cabro) anti-antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (anti AgsHB) que se ponen en contacto y reaccionan con el suero del paciente que presumiblemente contiene el AgsHB. El AgsHB presente en la muestra del paciente forma un complejo con el anticuerpo de la perla. Al agregar a este complejo anti HBs (humano) marcado con I^{125} , éste se une con el antígeno previamente ligado al anti HBs de las perlas. Puesto que la radioactividad asociada con las perlas es directamente proporcional al contenido de AgsHB de la muestra, en cuanto mayor sea ésta, mayor será la cantidad de antígeno presente en el suero (2).

Procedimiento.

1. Remover la tapadera del tubo que contiene las perlas revestidas de anticuerpo, adaptándole antes la punta dispensadora.
2. Empujar hacia abajo la punta dispensadora con los dedos índices para dejar caer las perlas dentro de cada uno de los pozos de la bandeja de reacción.
3. Pipetear 0.2 ml. (200 ul.) de control negativo dentro

de los primeros seis pozos propiamente marcados como control negativos y 0.2 ml. de control positivo en cada uno de los siguientes dos pozos propiamente marcados como control positivo.

4. Pipetear luego 0.2 ml. de las muestras de suero en cada uno de los pozos subsiguientes.
5. Cubrir la bandeja de reacción con una lámina selladora y con cuidado golpear la bandeja con la palma de la mano para sacar las burbujas de aire.
6. Incubar la bandeja a 45° Centígrados (más o menos 1° Centígrado) por dos horas.
7. Al final del período de incubación remover la bandeja del baño de agua y quitar la lámina selladora.
8. Lavar dos veces aspirando el contenido de cada pozo de reacción, usando cada vez 5 mililitros de agua desmineralizada.
9. Agregar luego 0.2 ml. de anti-HBs I¹²⁵ a todos los pozos de reacción. Mezclar.

10. Incubar nuevamente la bandeja de reacción por una hora a 45° Centígrados.
11. Al final del período de incubación remover la bandeja y quitar la lámina selladora.
12. Lavar dos veces aspirando el contenido de cada pozo de reacción, utilizando cada vez 5 mililitros de agua des_u mineralizada.
13. Transferir luego las perlas de la bandeja de reacción a los tubos de conteo (invirtiendo la bandeja de reac_u ción sobre éstos y sosteniéndola muy firmemente, golpear para que las perlas caigan en el tubo respectivo).
14. Con previo calentamiento del Gamma-cord proceder luego a leer los resultados (2).

Controles.

El HEPRIA B incluye entre sus reactivos sueros de con_u trol positivo y negativo, los cuales se procesaban de la misma manera que los sueros de los donantes con la varian_u te que el suero control negativo se procesaba seis veces y el control positivo por duplicado. Estos controles eran

corridos cada vez que se verificaba la prueba para comprobar la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad del método sirviéndonos además para la identificación de falsos negativos y positivos.

Lectura de los Resultados.

Para obtener los resultados de los controles positivos y negativos, así como de las muestras de los donantes, los tubos debidamente identificados que contenían las perlas revestidas con I^{125} se colocaron en el gamma-cord para verificar su conteo, anotando las cuentas por minuto que se utilizaron para el cálculo de los resultados.

Cálculos.

Con el ejemplo que se presenta el conteo por minuto (c.p.m.), es el valor obtenido después de sustraer el conteo de fondo.

1- Cálculo del promedio del Control Negativo

a) Control Negativo

Tubo de Transferencia N°	Conteo por minuto (c.p.m.)
1	120
2	135
3	155
4	115
5	126
6	<u>100</u>
	Total 751

$$\text{Promedio del Control Negativo} = \frac{\text{Total cpm}}{\text{Total N° de muestras}} = \frac{751}{6} = 125$$

b) Valores Variantes

En algunos de los conteos se observa variación en c.p.m.; por lo tanto, los valores variantes que caigan fuera de los márgenes de 0.5 - 1.5 por el promedio del Control Negativo deben ser descartados.

Si en una sola prueba se observan más de dos variantes, esta prueba tiene que repetirse.

2- Cálculo del Promedio del Control Positivo

Control Positivo

Tubo de Transferencia N°	Conteo por minuto (c.p.m.)
7	2500
8	<u>2000</u>
	Total 4500

$$\text{Promedio del Control Positivo} = \frac{\text{Total cpm}}{\text{Total N}^\circ \text{ de muestras}} = \frac{4500}{2} = 2250$$

3- Cálculo de la Relación del Control Positivo: Control Negativo

Se divide el promedio del Control Positivo entre el promedio del Control Negativo.

La técnica ha sido diseñada para obtener una relación mayor o igual que 5. Si no se logra esta relación la prueba se debe repetir y los datos se deben considerar como no válidos.

Ejemplo:

$$\text{Relación} = \frac{\text{Promedio del Control Positivo}}{\text{Promedio del Control Negativo}} = \frac{2250}{125} = 18$$

4- Determinación del Valor Mínimo Positivo (VMP) (MPV)

El valor mínimo positivo es igual al promedio del control negativo por dos (el valor mínimo positivo es dos veces el control negativo del conteo promedio por minuto).

$$125 \times 2.0 = 250$$

Esto quiere decir que una muestra que tenga un c.p.m. de 250 ó más será considerada reactiva al HBsAg (2).

Interpretación de los Resultados.

El valor mínimo determinado del AgsHB para el método de Hepria B es de 2.0 veces el control negativo del conteo promedio por minuto. Las muestras que tienen una reacción de al menos 2.0 veces del control negativo promedio del con_{te}o por minuto son considerados como reactivas al AgsHB. El conteo promedio del control positivo por minuto debe de ser por lo menos 5 veces el promedio del conteo por minuto del control negativo; si estos valores no se logran, la prueba debe ser repetida (2) (ver hoja de cálculo, pág. 25).

IEPRIA-B



Calculation Sheet

Antibody to Hepatitis B Surface Antigen (Anti-HB_s)¹²⁵I (Human)

Run No. _____ Instrument Background Counts _____

: For gamma counters that do not subtract background counts, background adjustment must be performed in Step 1 and 6. If gamma counter automatically subtracts background counts eliminate (x) in Steps 1, 4, and 6.

1 Calculation of Negative Control Mean

Sample No.	Gross cpm	(x)	= Net cpm
1	_____	_____	120
2	_____	_____	135
3	_____	_____	155
4	_____	_____	115
5	_____	_____	126
6	_____	_____	100

751 125 (A)

(A) = Negative Control Mean

2 Calculation to Eliminate Variant Numbers

$$(A) \frac{125}{\quad} \times 0.5$$

$$(B) \frac{62.5}{\quad}$$

$$(A) \frac{125}{\quad} \times 1.5$$

$$(C) \frac{187.5}{\quad}$$

Any number less than (B) or greater than (C) is considered variant

3 Calculation of Variant-Free Negative Control Mean (if necessary)

Sample No.	Net cpm
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

5 _____ (A')

(A') = Variant Free Negative Control Mean

4 Calculation of Positive Control Mean

Sample No.	Gross cpm	(x)	= Net cpm
1	_____	_____	2,500
2	_____	_____	2,000

4,500 2,250 (D)

(D) = Positive Control Mean

5 Calculation to Determine Valid Run

$$(A) \frac{125}{\quad}$$

$$(D) \frac{2,250}{\quad}$$

18 (E)

$$(A) \frac{125}{\quad} (D) \frac{2,250}{\quad}$$

Note: Use (A') if step 3 was necessary.

If (E) is equal to 5 or more, the run is considered valid

6 Calculation of Minimum Positive Value

$$(A) \frac{125}{\quad}$$

x 2.0

$$\frac{250}{\quad} (F)$$

$$+ \frac{\quad}{\quad} (x)$$

(G)

Samples with count rate equal to or greater than (G) should be considered positive for HB_sAg

HOJA DE ENTREVISTA

Nombre del Donante _____

Fecha de Nacimiento _____

Edad _____ Sexo _____

Domicilio: A- Familiar _____ Tel. _____

B- Trabajo _____

INTERROGATORIO:

1- ¿Se ha puesto alguna vez amarillo? _____

¿Ictérico _____

¿Ha tenido Hepatitis? _____

2- ¿Ha tenido contacto estrecho con
persona con esta enfermedad? _____

¿Cuándo? _____

3- ¿Ha recibido inyecciones con jeringa
o agujas no descartables? _____

¿Cuándo? _____

4- ¿Ha recibido transfusiones de san-
gre, plasma u otros componen-
tes de la sangre? _____

¿Cuándo? _____

5- ¿Le han practicado injertos de
piel o tatuajes? _____

¿Cuándo? _____

IV. RESULTADOS

Para realizar la prueba de Hepria B se tomó una muestra de cada uno de 1121 donantes profesionales considerados sanos que llegaron a donar su sangre al Hospital General del ISSS. La población de donadores profesionales estudiada incluía 1010 donantes del sexo masculino y 111 donantes del sexo femenino.

Cuadro 1. En este cuadro se observa que de los 1121 donantes profesionales analizados a los cuales se les verificó la prueba Hepria B, 16 fueron positivos, esto representa un porcentaje de 1.4% de la población estudiada. Los casos negativos fueron 1105 lo que constituye el 98.6% de la población estudiada.

Cuadro 2. Este cuadro presenta los resultados de las pruebas realizadas a los 111 casos del sexo femenino de la muestra total. De estos, 3 casos fueron positivos y 108 casos negativos, que representan los porcentajes del 2.7% y 97.3% respectivamente.

Cuadro 3. En este cuadro vemos las pruebas realizadas a los 1010 casos correspondientes al sexo masculino, se obtuvieron los siguientes resultados: 997 casos negativos que representan el 98.8% del total de casos analizados y

CUADRO 1

RESULTADOS GLOBALES DE LA PRUEBA CUALITATIVA HEPRIA B
PARA LAS 1121 MUESTRAS REALIZADAS

TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	CASOS NEGATIVOS	% DE CASOS NEGATIVOS	CASOS POSITIVOS	% DE CASOS POSITIVOS
1121	1105	98.6%	16	1.4%

CUADRO 2

RESULTADO DE LA PRUEBA CUALITATIVA DE HEPRIA B PARA
LOS 111 CASOS DEL SEXO FEMENINO

TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	CASOS NEGATIVOS	% DE CASOS NEGATIVOS	CASOS POSITIVOS	% DE CASOS POSITIVOS
111	108	97.3%	3	2.7%

CUADRO 3

RESULTADO DE LA PRUEBA CUALITATIVA DE HEPRIA B PARA
LOS 1010 CASOS DEL SEXO MASCULINO

TOTAL DE CASOS ESTUDIADOS	CASOS NEGATIVOS	% DE CASOS NEGATIVOS	CASOS POSITIVOS	% DE CASOS POSITIVOS
1010	997	98.8%	13	1.2%

V. D I S C U S I O N

Los resultados de este trabajo muestran el 1.4% de positividad al AgsHB en la población estudiada, esta cifra es menor que la citada por Maestre y colaboradores (24) en El Salvador (2.7%).

Creemos que nuestros hallazgos son más confiables que los obtenidos por Maestre y colaboradores en 1972. Se hace esta aseveración porque la población estudiada por ellos fue menor (585 donadores) de los cuales 16 resultaron positivos, lo que les dio un porcentaje del 2.7%. La población estudiada por nosotros fue mayor (1121) de los cuales obtuvimos 16 resultados positivos, lo que nos produjo el 1.4%. Además, el método utilizado por Maestre y colaboradores fue el de contraelectroforesis cruzada en Gel-agar que es una prueba de segunda generación de menor sensibilidad y el cual ha sido comprobado produce muchos resultados falsos positivos pero que debido a su velocidad, fácil verificación y relativo bajo costo (15) era inicialmente el método más comunmente usado para la detección del AgsHB; en cambio el método utilizado por nosotros en el presente estudio fue el de RIA, que es una prueba de tercera generación con una sensibilidad de 100 a 1000 veces mayor que la sensibilidad de la prueba en Gel agar (15). Además RIA no

presenta las dificultades de lectura e interpretación que presenta la contraelectroforesis cruzada en gel-agar (27). Los resultados del presente trabajo caen dentro de los valores límites (1-2%) reportados por Cherubin y Prince (10) para grupos similares al nuestro y utilizando el mismo procedimiento de laboratorio.

Las diferencias de los porcentajes de portadores del antígeno australiano reportados por Maestre para el sexo masculino (2.8% en 543 donadores) y para el sexo femenino (2.3% en 42 donantes) con los porcentajes de incidencia obtenida en nuestro estudio para el sexo masculino (1.2% en 1010 donantes) y para el sexo femenino (2.7% en 111 donantes) podrían explicarse en base a una menor sensibilidad del método empleado por Maestre et al, por ejemplo, los resultados de Maestre y colaboradores para ambos sexos son muy similares entre hombres y mujeres. Es interesante que aun con pocas mujeres estudiadas el porcentaje de ellos es muy similar al encontrado en este trabajo (utilizando una metodología más sensible). Como contraste, el resultado obtenido en los hombres por Maestre es el doble del encontrado por nosotros. Desafortunadamente, la diferencia entre los resultados globales de Maestre y colaboradores y los encontrados en este trabajo no pueden analizarse estadísticamente por tratarse de procedimientos de laboratorio de

sensibilidad diferente. Lo mismo se puede decir de la diferencia entre los sexos encontrada por aquellos investigadores y la diferencia reportada en la presente investigación.

El peligro de transfundir el virus de la hepatitis B y de sufrir posteriormente la enfermedad al utilizar en los bancos de sangre, sangre de donadores profesionales que sufran o hayan padecido hepatitis ha sido evidenciado por muchos investigadores (20,23). Esto es sin duda alguna un serio problema hospitalario y de salud pública. En países como El Salvador, el problema se complica porque los donadores de sangre profesionales son en su mayoría personas de bajos recursos de quienes es muy difícil obtener una historia cierta de padecimientos anteriores, pues por su condición de donadores profesionales la mayoría niega todo tipo de antecedentes, que podría señalarlos como posibles portadores del virus de la hepatitis y como tales ser rechazados, perdiendo así la oportunidad de conseguir algún dinero por la sangre vendida.

Queremos resaltar el peligro que representa para los pacientes el riesgo de infección con la sangre de los donadores que contengan el AgsHB, infección que en muchos de los pacientes no es detectada debido a que no permanecen en el hospital el tiempo suficiente para que la hepatitis

se logre evidenciar. Además, debe advertirse que el riesgo de adquirir hepatitis no solo lo es para el receptor de la sangre sino que también para todos aquellos trabajadores en salud que en una forma u otra se ponen en contacto con la sangre o algún derivado de ella.

Debido a que la hepatitis transmitida por vía parenteral puede ser producida por el virus de la hepatitis A, el de hepatitis B y por los virus llamados no A no B, es imposible hasta el momento mediante la prueba para la detección del antígeno australiano (específico para el virus B) bajar hasta cero la frecuencia de la hepatitis post transfusional (20). Sin embargo, para disminuir al máximo este tipo de contagio, es recomendable utilizar en todo tipo de manipuleo de productos sanguíneos, equipo descartable (agujas, jeringas, etc.); además, de gran importancia resulta la educación del personal médico sobre los riesgos de la sangre y sus componentes; riesgos que son mayores con ciertos derivados de la sangre y que aumentan con cada unidad administrada debiendo enfatizar que se reduzcan las transfusiones innecesarias.

Para nuestro trabajo y los de otros autores el método RIA Hepria B fue de fácil ejecución, específico (26,27) altamente sensible (15) y reproducible para la de

tección del AgsHB. Debe mencionarse que aún cuando el costo de este reactivo y del aparato gamma centello es elevado los beneficios obtenidos para el paciente y la institución son muchos. Por ejemplo, las consecuencias de la adquisición post-transfusional de la hepatitis B agravará la salud del paciente. Este posteriormente regresa a la institución a ser tratado por hepatitis ocasionando al ISSS mayores gastos de hospitalización, de medicamentos y pago del 75% del costo de la incapacidad del enfermo. Las desventajas que se le detectaron a este método fueron la utilización de material radiactivo y el corto período de vencimiento de éste.

Recomendamos que en todos los Bancos de Sangre se establezca la determinación del antígeno australiano de preferencia por medio del RIA. En otros países es requisito indispensable, habiéndose registrado en estos sitios una marcada disminución de la hepatitis producida por el virus VHB adquirido por transfusiones (26). También recomendamos la exclusión de todos los donadores que tengan antígeno australiano positivo con la idea de disminuir al máximo la incidencia de hepatitis por virus B post-transfusional. Además se debe controlar periódicamente a estos donadores por representar un grupo de alto riesgo.

Sugerimos que el laboratorio clínico del Hospital General del Seguro Social preste este servicio a todos aquellos bancos de sangre que por razones económicas no pudieran establecer esta prueba.

VI. RECOMENDACIONES

1. Investigar AgsHB de rutina en los Bancos de Sangre utilizando para ello el método RIA Hepria B, ya que éste es uno de los mejores métodos en la actualidad.
2. Centralizar la prueba de investigación AgsHB en el Laboratorio Clínico del Hospital General del ISSS con el objeto de dar este servicio a todos los Hospitales Regionales del país.
3. Excluir a todos los donadores a los que se les detecte en sangre el antígeno australiano y así disminuir la frecuencia de la hepatitis postransfusional debida al virus de la hepatitis B.
4. Recomendamos utilizar material descartable, jeringas y agujas en todos los procedimientos de laboratorio y Bancos de Sangre, para disminuir el riesgo de contaminación, dentro del personal.

VII. BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, S. L.: Incidencia del Antígeno Australiano en donantes de la Ciudad de Colón, Panamá. Trabajo de Investigación presentado en el Segundo Curso Centroamericano de Inmunohematología aplicado al Banco de Sangre en el Hospital General del Seguro Social. Agosto 1982.
2. Antibody to Hepatitis B surface antigen (anti-HB_s125 Human) Hepria B. Nabi North American Biologicals, Inc. Rev. Nov. 1979.
3. Bekeris, L. G., García, L. J. Hurtado, H. M., Ariza, A. Frecuencia del Antígeno de Australia en el Banco de Sangre del Hospital Militar Central. Trabajo presentado al II Congreso Colombiano de Medicina Interna, Bogotá. Tribuna Médica. Tomo XLVII 9 (553), A11-A14, Mayo 1973.
4. Blummburg, B.S. et al: Australia Antigen and Hepatitis. Lancet 1:143-144, Julio 19, 1969.
5. Blummburg, B.S., and Vinich, S. A.: New Antigen in Leukemia Sera, J.A.M.A., 191:541-546, Mayo 1955.
6. Blummburg, B.S., and Melaitin, L.: Australia Antigen and Hepatitis. Arch. Intern. Med. 125:287-292. Mayo 1970.

7. Blummburg, B.S., Gerstey, B.J., Hungerford, D.A., London, W.T., Sutnick, A.J.: A Serum Antigen (Australia Antigen) in Down's Syndrome, Leukemia and Hepatitis, Ann. Intern. Med. 66(5):934-931. Mayo 1969.
8. Blummburg, B.S. et al.: Practical Applications of the Antigen test. Postgraduated Medicine: 1, 70-76, Dic. 1971.
9. Blummburg, B.S., et al; Australia Antigen and Hepatitis, J.A.M.A. 207(10),143-144, Marzo 10, 1969.
10. Cherubin, C.E., and Prince, A.M. Serun hepatitis specific antigen (SH) in commercial and volunteer sources of blood. Transfussion 11:25-27.
11. Davis, B.D., Dulbecco R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S., Microbiology. Third edition. Harper & Row, Publishers. 1218-1229, 1980.
12. Drob, P., et al; Antigen Chronic Hepatitis, Gastroenterology. 61(1):91-95; jul. 1971.
13. Figueroa, M.: Enfermedades Virales en Centroamérica. 1a. edición, Lithopross Industrial, S.A., Tegucigalpa, Honduras, 191-214, 1983.

14. Fox, H.H., Niezi, S.P., and Sherlock, S.: Hepatitis Associated Antigen in Chronic Liver Disease. *Lancet*: 2: 609-612, Sept. 20, 1969.
15. Gerety, R.J., Hoofnagle, J.H. Mitchell, F.D., Barker, L.F. and Meyer, H.M.: Evaluation of Hepatitis B Antigen Testing in Federally Licensed Blood Banks in the United States. *A.J.C.P.* 63(4) 573-579, 1975.
16. Giles, J. et al: Viral Hepatitis. *New England J. Med.*, 281(3):119-122, julio 17, 1969.
17. Gilnick, G., et al: Australia Antigen in Chronic Active Liver Disease with Cirrosis. *Lancet*: 2:285-288, Agosto 9, 1969.
18. Guyton, A.C.: *Tratado de Fisiología Médica*. V edición. Editorial Interamericana. Philadelphia, 81-83, 1977.
19. Haermening, P. *Modern Blood Banking and Transfusion Practices*. F.H. Davis Company. Philadelphia. 388-396. 1983.
20. Holland, P. et al: Failure of Australia Antibody to prevent post-transfusion hepatitis. *Lancet*: 2:553-555. Sept. 13, 1969.

21. Krugman, S., Giles, J., and Hammand, J.: Infectious Hepatitis, J.A.M.A. 200(5):365-373, 1957.
22. Krugman, S. and Giles, J.P.: Viral Hepatitis, J.A.M.A. 212(6):1019-1029, Mayo 11, 1970.
23. Linares, J.: Guñido, M.D., Curso Avanzado de Inmunohe-
matología para Hemoterapistas. Sociedad Venezolana de
Hematología. Comité de Docencia Hospital de la Materni-
dad Concepción Palacios. Publicado en Caracas, Venezue-
la, 1982.
24. Maestre, M., Chicas, J.A., O.C.R. Astacio, N.J.: Antí-
geno Australiano. Trabajo presentado en el XX Congreso
Médico Nacional, San Salvador, Arch. Col. Med. El Sal-
vador, 26(3), 916-919, Jul.-Sept. 1973.
25. Mayora E., C.: Hepatitis Viral y Embarazo. Arch. del
Colegio Médico de El Salvador. 24(2), 35-40, Abril-ju-
nio 1971.
26. Moore, B.P.L.: Seguridad de la Calidad en los Laborato-
rios de Transfusión Sanguínea. Edición en Español. Or-
ganización Panamericana de la Salud. Mayo 1980.

27. Nath, N., Dodd, R.Y., Ledman, R. Fang, C.T. and Barker, L.F.: Comparative Evaluation of Radioimmuno assay Kits used for Testing Blood for Hepatitis B Surface Antigen A.S.C.P. 25(2), 214-218, 1981.
28. Prophylactic gammaglobulin for prevention of endemic Hepatitis. Estudio cooperativo. Arch. Int. Med. 128(5): 723-737, Nov. 1971.
29. Prevention of viral hepatitis. Editorial J.A.M.A., 218 (11). 1963, Dic. 13, 1971.
30. Robbins, S.L.: Patología Estructural y Funcional, 1a. edición en español. Nueva Editorial Interamericana. México, D.F., 951-983, 1975.
31. Shulman, R.: Hepatitis-Associated Antigen. Am.J.Med. 49:669-691, Nov. 1970.
32. Terety, R.J., Hoofnagle, J.H. Barker, L.F., Harry M. and Mitchell, F.D.: Evaluation of Hepatitis B Antigen Testing in Federally Licensed Blood Banks in the United States. A.J.C.P. 63:573-580, Enero 1975.

33. Tong, M.J., Sun, S.C., Schaeffler, N.K.L.D. Australia Antigen and Hepatocelular carcinoma in Taiwan. Ann, Intern. Med. 75:687-691. Mayo 1971.
34. Wright, R., McCallam, R.W., and K.: Australia Antigen in Acute and Chronic Liver Disease. Lancet: 1:117-121, julio 19, 1969.
35. Zuckerman, A.J.: Avances recientes contra la hepatitis viral. El Médico, 69-74, Colombia, Sept. 1971.