

# LA INVESTIGACION DE LA HEPATITIS INFECCIOSA (HEPATITIS A) EN PRIMATES NO HUMANOS<sup>1</sup>

Dres. Maurice R. Hilleman,<sup>2</sup> Philip J. Provost,<sup>2</sup> Victor M. Villarejos,<sup>3</sup> Eugene B. Buynak,<sup>2</sup> William J. Miller,<sup>2</sup> Oswald L. Ittensohn,<sup>2</sup> Bohdan S. Wolanski<sup>2</sup> y William J. McAleer<sup>2</sup>

*Este trabajo da cuenta de los importantes adelantos en las investigaciones de la hepatitis A humana, cuyo virus es un agente de características similares a los enterovirus, y que se puede propagar a los monos tíes. Dado que el animal y sus tejidos infectados permiten efectuar ensayos relativos al virus, al antígeno y al anticuerpo de la hepatitis A, las investigaciones futuras dependen, en gran medida, de la disponibilidad de estos primates y por lo tanto del mantenimiento de la especie en la naturaleza.*

La hepatitis humana A (hepatitis infecciosa) y la hepatitis B (hepatitis por suero homólogo) siguen ocupando un lugar de importancia fundamental entre las enfermedades que afectan a la humanidad en el mundo entero. Ambos virus han resistido todos los esfuerzos dirigidos hacia la propagación significativa y confiable *in vitro* en el laboratorio, y solo hasta hace poco los primates no humanos han sustituido a los voluntarios humanos como medio para estudiar esas enfermedades. Es interesante destacar que ambos virus han encontrado sus huéspedes animales, si bien en lados opuestos del mundo—el de la hepatitis B en el chimpancé del Viejo Mundo y el de la hepatitis A en el mono tí del Nuevo Mundo, especialmente el de bigote blanco, *Saguinus mystax*. Este trabajo trata acerca del tí *mystax* y de los nuevos e importantes adelantos médicos que este ha proporcionado en tiempos recientes en los estudios de la hepatitis A humana, así como para los ensayos

de control de la inocuidad de la vacuna de hepatitis B humana (1-11).

La utilización del mono tí en las investigaciones sobre la hepatitis A comenzó cuando Deinhardt y sus colaboradores (12-15) demostraron aumentos en la concentración de enzimas séricas y patología hepática en el *S. nigricollis* (boquiblanco) y en *S. oedipus* (copetudo) al administrárseles suero de pacientes que padecían de hepatitis pero no cuando se utilizaba suero de personas normales. Si bien otros investigadores notificaron hallazgos similares (16, 17), Parks *et al.* (18, 19) realizaron experimentos con *S. oedipus* y presentaron pruebas que sugieren que el virus GB, la cepa principal del virus de la hepatitis estudiada por Deinhardt, podría ser un agente innato en el tí.

## Cepa CR326 de la hepatitis A

Los estudios realizados en nuestros laboratorios con hepatitis A condujeron a la recuperación (1) de agentes en tíes *mystax* obtenidos de casos de hepatitis A ocurridos en Costa Rica. Estos agentes (1-3) causaron cambios bioquímicos y patología hepática en monos tí, similares a los descritos por Deinhardt *et al.* (12-15). La cepa

<sup>1</sup> Tomado de *Primera Conferencia Interamericana sobre la Conservación y Utilización de Primates no Humanos en las Investigaciones Biomédicas*. Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica 317, Washington, D.C., (en prensa).

<sup>2</sup> División de Investigaciones de la Biología Vérica y Celular, Instituto Merck de Investigaciones Terapéuticas, West Point, Pennsylvania, E.U.A.

<sup>3</sup> Universidad del Estado de Luisiana, Centro Internacional de Investigaciones y Capacitación en Medicina, San José, Costa Rica.

Costa Rica 326 o CR326 fue seleccionada para estudios intensivos.

La relación etiológica entre el virus CR326 y la hepatitis humana se estableció (1-10) sobre la base de que: a) el elemento esencial que se requiere para iniciar la infección hepática propagable en serie en los títes era suero o sangre de un caso de hepatitis A humana; b) el pase en serie en títes, de sueros procedentes de títes no infectados no causó hepatitis; c) la liberación de enzimas en la corriente sanguínea y los hallazgos histopatológicos en los títes inoculados con el agente o los agentes de hepatitis propagados por títes, se parecían a los de la hepatitis humana; d) el tamaño pequeño, la temperatura, el éter y la estabilidad a los ácidos del agente coincidían con las propiedades conocidas del virus de la hepatitis A humana determinados en estudios anteriores con voluntarios humanos; y, de aún más importancia, e) pudimos desarrollar una prueba de neutralización del suero (2, 3, 10) llevada a cabo en títes mediante la cual se pudo demostrar que los pacientes de hepatitis A pero no de hepatitis B desarrollaban anticuerpos neutralizantes contra el virus durante la convalecencia de su enfermedad.

#### Características de enzimas e histopatología en títes infectados con virus de hepatitis A humana

La figura 1 presenta los niveles séricos de enzimas de deshidrogenasa isocítrica y los resultados de biopsias del hígado o de autopsias realizadas en títes *mystax* en el primero y el cuarto pase de suero del caso 033 de hepatitis humana, que originó la cepa CR326 de virus de hepatitis A. Se observa que: a) las enzimas y las biopsias de todos los animales eran normales antes de la inoculación con el suero humano, y b) que todos registraron reacciones positivas a la hepatitis entre los días 25 y 55. Se obtuvieron resultados similares en el cuarto pase en series en títes excepto que se acortó en forma significativa el período en que ocurrieron los

aumentos máximos de enzimas. Los resultados de las pruebas con transaminasa oxaloacética glutámica en el suero siempre confirmaron los de las pruebas de la deshidrogenasa isocítrica.

#### Hallazgos de la prueba de neutralización del suero (2, 3, 5, 7, 9, 10)

En la prueba de neutralización del suero, el suero que había de ensayarse se incubó durante una hora a 37°C con cerca de 100 DI<sub>50</sub> de virus CR326 de hepatitis A, y luego se inoculó por vía intravenosa a grupos de 12 títes *mystax*. Se realizaron observaciones semanales de los animales con objeto de verificar si aumentaban las enzimas en forma significativa. Los hallazgos se registraron como porcentaje acumulativo de animales positivos, de acuerdo con el tiempo, como se muestra en la figura 2. Por regla general se terminaban los experimentos a las ocho semanas, ya que pocos animales mostraban reacciones positivas después de ese tiempo. Para cada suero se calculó el *valor de neutralización*, que era la reducción porcentual de animales que mostraban hepatitis después de la inyección con la mezcla de virus y suero, comparados con los que recibieron solo el virus. En pruebas realizadas con pares de sueros, se calculó la *diferencia* en el valor de neutralización que resultó de ensayos con sueros obtenidos antes y después de la enfermedad, o durante el período de convalecencia. En el ejemplo, hubo poca o ninguna reducción de virus con el suero extraído antes de la enfermedad, pero sí se observó una neutralización muy marcada en la muestra de suero del período de convalecencia. Los *valores de neutralización* de los sueros obtenidos antes y después de la enfermedad fueron 10 y 91, respectivamente, y la *diferencia*, 81.

La figura 3 muestra los resultados en una serie de pruebas de neutralización del suero realizada con sueros obtenidos antes y después de la enfermedad en casos humanos de hepatitis A y B natural o experimental y con

FIGURA 1—Determinaciones de enzimas y resultados histopatológicos por biopsia o autopsia en el pase primero y cuarto de cepa CR326 de hepatitis en tities.

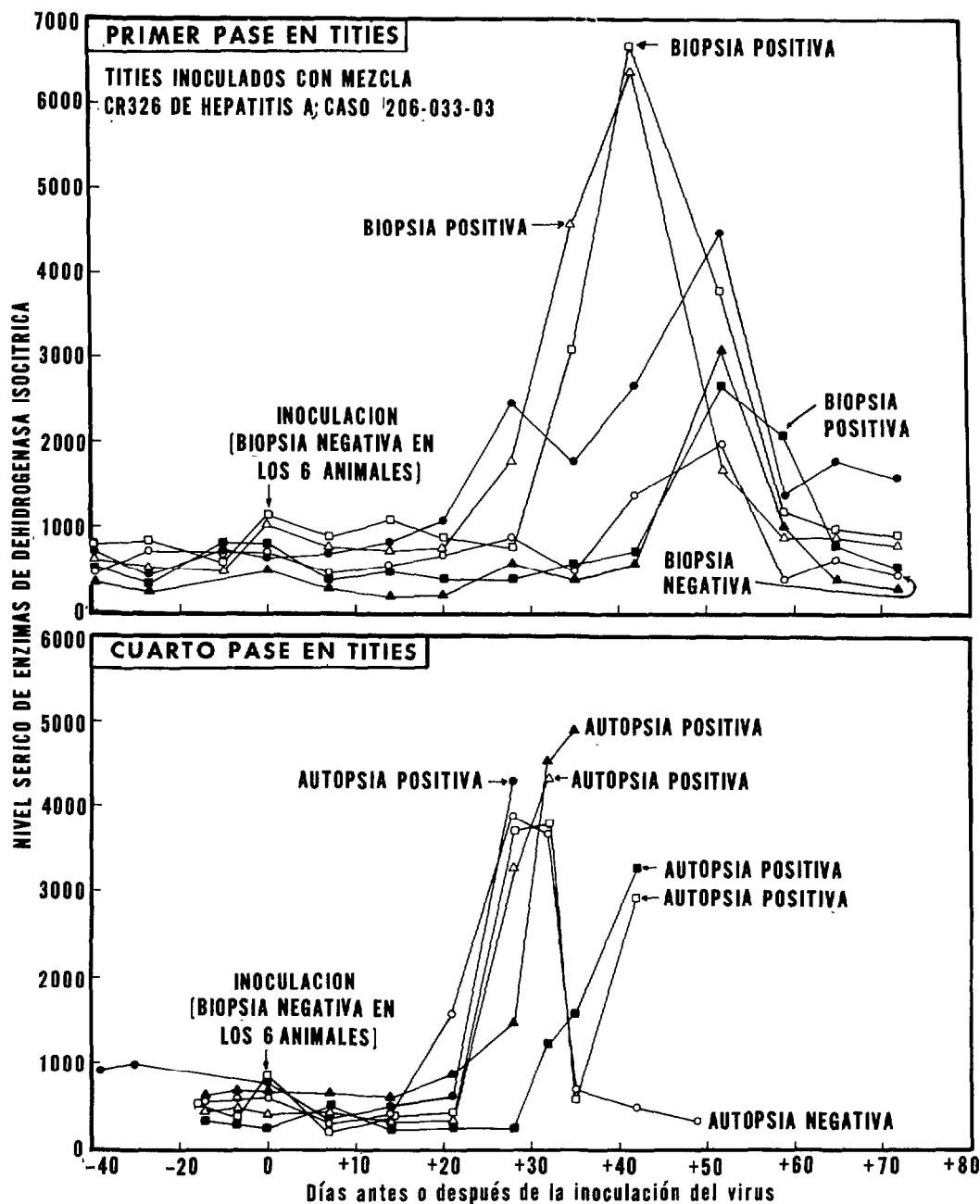
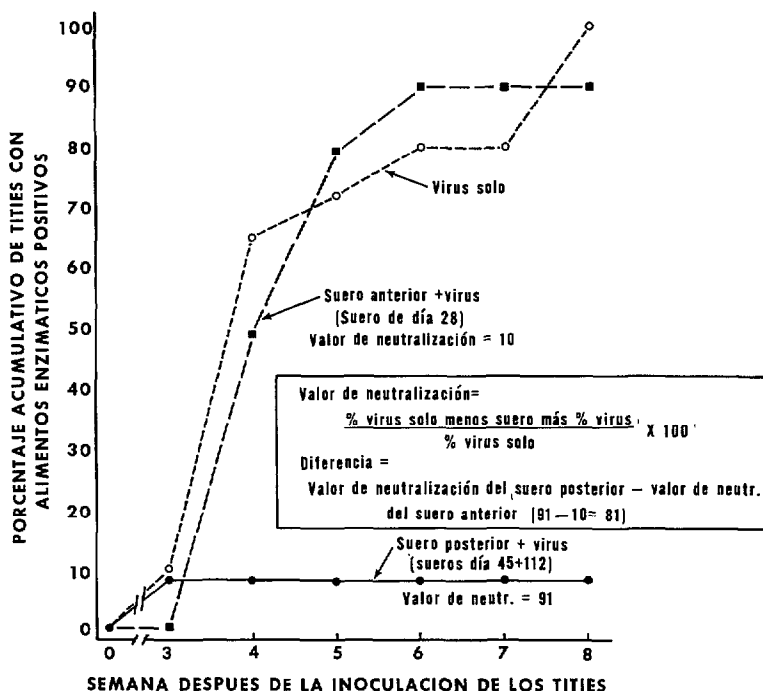


FIGURA 2—Muestra de prueba de neutralización para anticuerpos de la hepatitis A utilizando pares de sueros del caso 207 de hepatitis A.



inmunoglobulinas humanas. En todos los casos de hepatitis A se observa el desarrollo de anticuerpos neutralizantes con respecto al virus CR326; las diferencias en los valores de neutralización oscilaron entre 36 y 96, siendo de 51 o más en la totalidad excepto en uno. Ningún caso de hepatitis B mostró ese aumento de anticuerpos. Es importante destacar que las tres muestras de inmunoglobulina humana mostraron valores de neutralización de 59 o más.

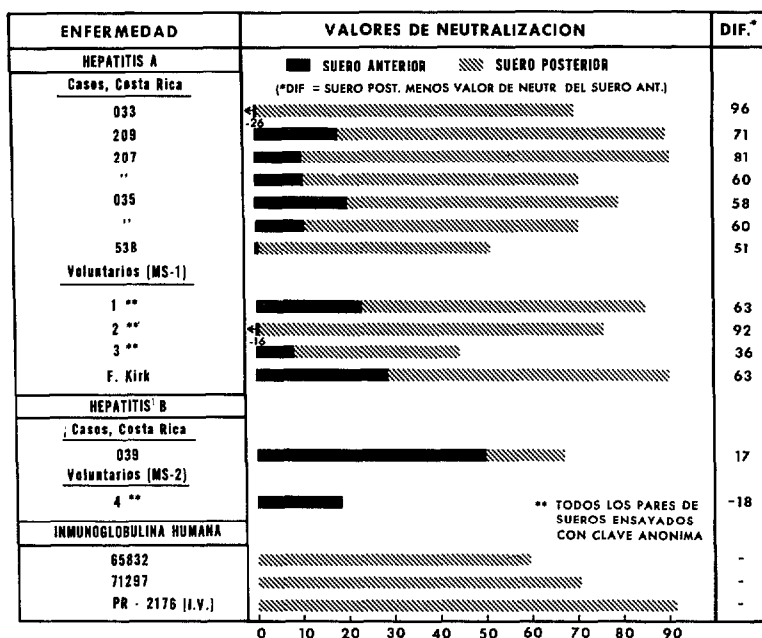
Los hallazgos sirvieron para relacionar el virus CR326 propagado por titíes con la hepatitis A en el hombre, si bien no hubo ninguna relación con la hepatitis B.

Propiedades biofísicas y bioquímicas del virus CR326 de la hepatitis A humana (1-4, 6, 8)

La disponibilidad del virus CR326 y el hecho de que la especie *mystax* era susceptible al mismo nos permitió definir en forma precisa las propiedades biofísicas y bio-

químicas del agente de la hepatitis A humana. El cuadro 1 resume los resultados más importantes del estudio. La fuente del virus era el suero de monos tití infectados. En las pruebas se empleó virus que había sido purificado por separación en el gradiente de densidad. La determinación de la densidad vírica se realizó con la formación de bandas isopícnicas en un gradiente de cloruro de cesio, utilizando la infectividad del tití como indicador del virus. Se encontró que la densidad era de 1.34 g/cm<sup>3</sup>. El virus purificado en extremo del gradiente de cloruro de cesio, suspendido en agua destilada, fue inactivado al calor (100°C durante cinco minutos), pero quedó inactivado solo parcialmente cuando se calentó a 60°C durante una hora. El virus pudo inactivarse fácilmente mediante exposición a rayos ultravioleta y tratamiento con formalina al 1:4000 a 37°C durante tres días. Se observaron pruebas presuntivas del tipo de ácido nucleico ARN cuando el virus purifi-

FIGURA 3—Resultados de las pruebas de neutralización del suero al emplear cepa CR326 de virus A de hepatitis.



cado tomó el color rojo-naranja en la prueba de naranja de acridina, junto con la destrucción parcial de la infectividad del virus mediante tratamiento con ribonucleasa pancreática durante una hora a 60°C.

La figura 4(A) muestra la presencia del virus CR326 en un hepatocito seccionado del hígado de un titi infectado. Las partículas del virus tenían 27 m $\mu$  de diámetro, estaban presentes en el citoplasma pero no en el núcleo, y de vez en cuando se localizaban en vesículas de distintos tamaños. El hecho de

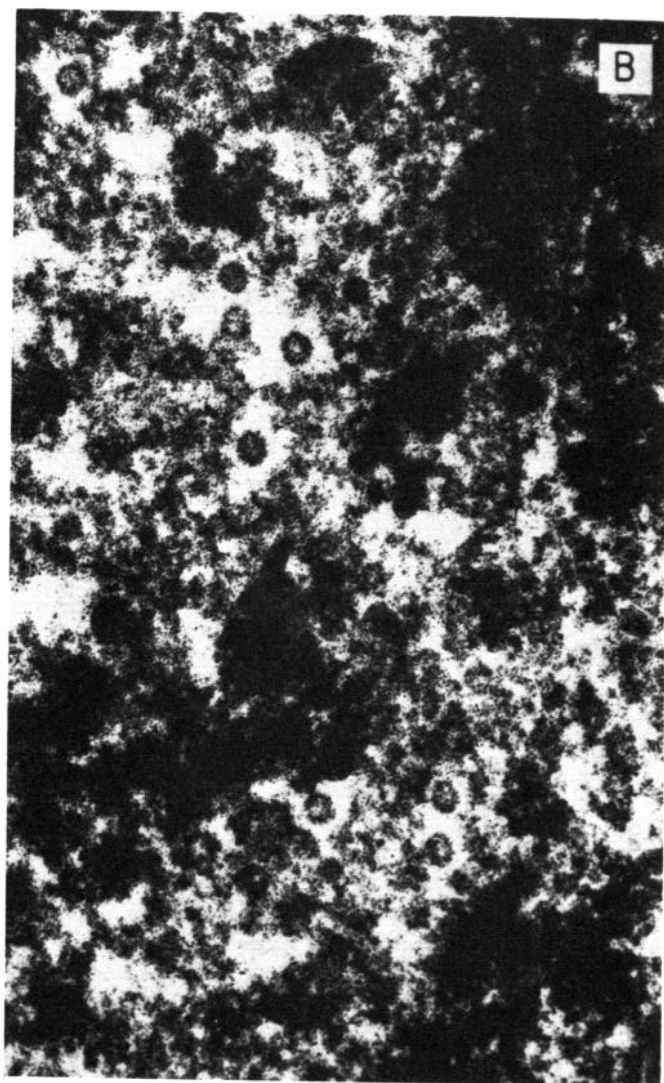
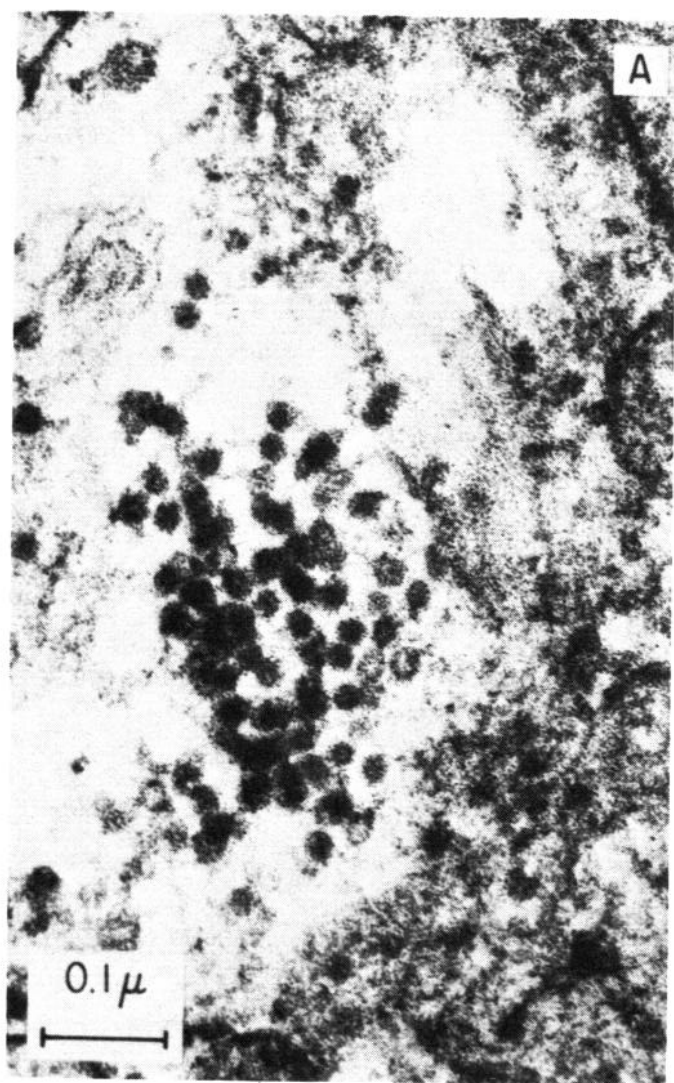
que las partículas de virus se ubicaran exclusivamente en el citoplasma apoyaba el concepto de que el virus era del tipo ARN. Para efectos de comparación, la figura 4(B) muestra las partículas del centro de 27 m $\mu$  de diámetro del virus de hepatitis B en los núcleos de las células de un hepatocito seccionado del hígado de un chimpancé.

La figura 5(A) presenta el aspecto del virus CR326 purificado cuando se observa con un microscopio electrónico. Las partículas del virus son de 27 m $\mu$  de diámetro y mor-

CUADRO 1—Caracterización del virus CR326 de hepatitis A humana.

Característica	Método de determinación
Densidad 1.34 g/cm <sup>3</sup>	Bandas isopícnicas, cloruro de cesio
Inactivado	Calor, 100°C, 5 minutos
Inactivación parcial	Calor, 60°C, 1 hora
Inactivado	Luz ultravioleta, 1 minuto a 1.1 vatios
Inactivado	Formalina, 1:4000, 3 días, 37°C
ARN	Colorante naranja de acridina, virus purificado con ribonucleasa pancreática, 1 hora, 60°C, destrucción parcial

FIGURA 4—(A) Partículas de virus de hepatitis A en el citoplasma de un hepatocito procedente de un tití infectado con virus CR326. La barra representa 0.1 micra. (B) Partículas de centro de hepatitis B en el núcleo de un hepatocito procedente de un chimpancé infectado con virus de hepatitis B.



fológicamente no se pueden distinguir de los enterovirus. La identificación de las partículas de la hepatitis A fue establecida por la calidad altamente infecciosa de la preparación de virus purificado al ser inoculada a los monos tití y por la neutralización específica de la infectividad del virus usando sueros de hepatitis A humana obtenidos en la convalecencia pero no en una fase anterior a la enfermedad. Para fines de comparación, la figura 5(B) muestra el antígeno australiano típico (20 m $\mu$ ), filamentos y partículas de Dane (42 m $\mu$ ) de hepatitis B que se encontraron en suero humano infectado.

La figura 6 es una micrografía electrónica de partículas de virus CR326 en un homogenado hepático de tití infectado, antes (izquierda) y después (derecha) de la reac-

ción con suero de convaleciente de hepatitis A humana (immunomicroscopia electrónica). Los halos característicos de moléculas de anticuerpos rodean las partículas de virus y las unen en un complejo inmunitario.

Las propiedades del virus CR326 muestran que este guarda estrecha relación con los enterovirus de la familia de virus picorna. Se distingue claramente de los rinovirus por su estabilidad a los ácidos. Difiere de la hepatitis B, que es un virus ADN, en las diversas formas morfológicas de la hepatitis B y en la localización citoplásmica del virus CR326, en contraste con la posición intranuclear del virus de la hepatitis B en por lo menos una fase de su síntesis. Maynard y colaboradores (20) recientemente realizaron estudios sobre el virus de hepatitis A, que se



FIGURA 5—(A) Cepa CR326 purificada de virus de hepatitis A humana preparada por separación en gradiente de densidad procedente del suero de un títí infectado. La barra representa 0.1 micra. (B) Antígeno australiano purificado, filamentos y partículas de Dane preparados a partir de sueros procedentes de un portador de hepatitis B humana.

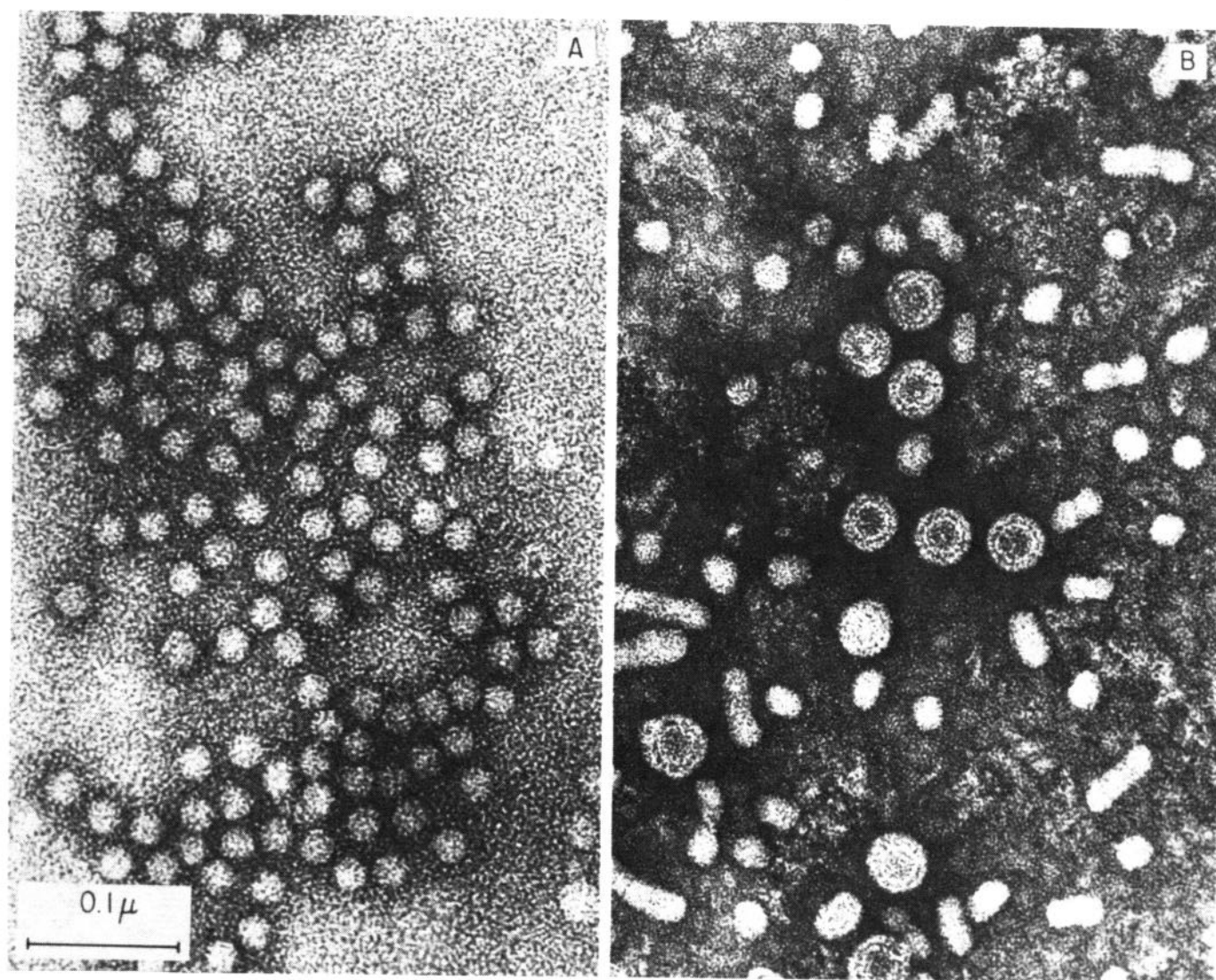
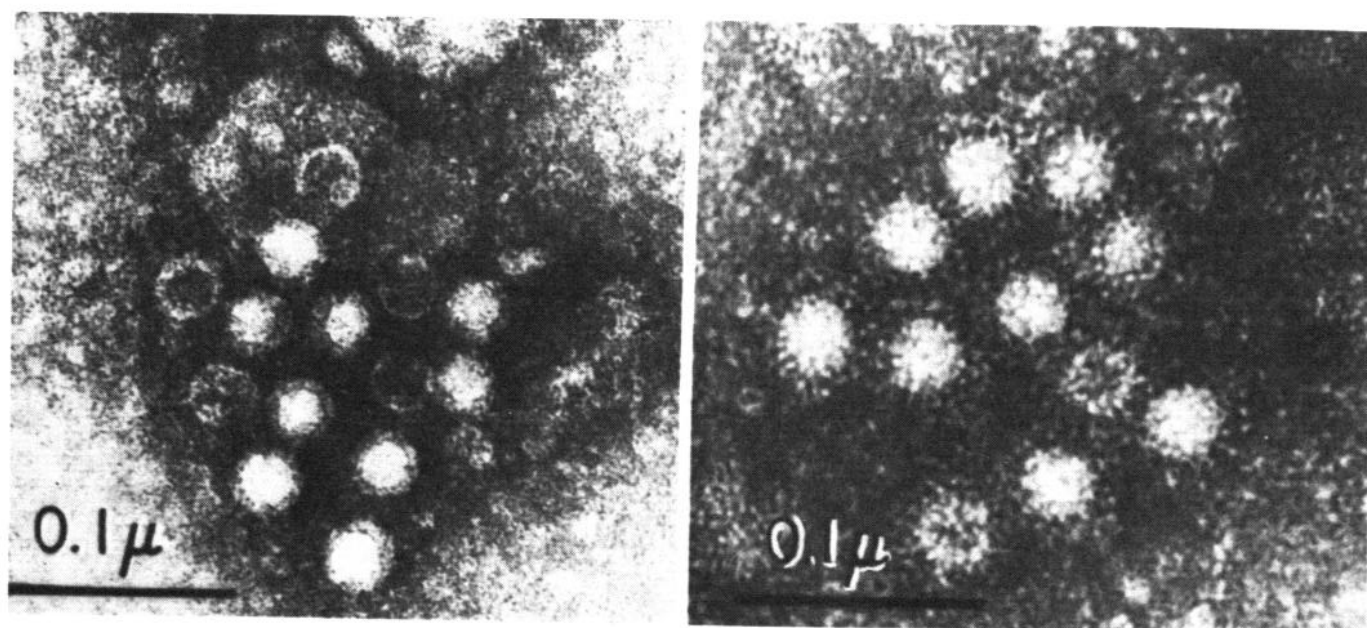


FIGURA 6—Virus CR326 en un homogenado de hígado infectado, antes (izquierda) y después de la reacción con suero humano de hepatitis A (derecha).



encontró en las heces de chimpancé y humanas. Notificaron la presencia de partículas de 27 m $\mu$  de diámetro con una densidad de 1.32 a 1.33 g/cm<sup>3</sup>. Estos datos coinciden con los resultados que obtuvimos con los virus CR326.

**Pruebas de inmunoadherencia específica (IA) y fijación del complemento (FC) para la hepatitis A humana (5, 7, 9, 10)**

Los estudios sobre la hepatitis A humana se han visto seriamente obstaculizados por la falta de análisis simples y económicos que permitan la determinación de anticuerpos específicos contra el virus de la hepatitis A. La propagación confiable del virus CR326 de la hepatitis A humana en los monos títí permitió la elaboración en nuestros laboratorios de métodos simples *in vitro* para la valoración de antígenos y anticuerpos de hepatitis A. Estos son la prueba de inmunoadherencia (IA) y la prueba de fijación del complemento (FC) para la hepatitis A humana empleando como antígeno extracto hepático de títí infectado con el agente CR326.

En el curso de nuestros estudios se

descubrió que los pacientes con hepatitis A pero no con hepatitis B desarrollan anticuerpos inmunoaderentes, de fijación del complemento y, tal como ya se señaló, anticuerpos neutralizantes en el suero durante sus infecciones. La figura 7 presenta los resultados de un caso típico de hepatitis A. El anticuerpo específico de fijación del complemento aparece poco después del inicio de la enfermedad y persiste después. Al principio de la enfermedad hay una frecuente manifestación transitoria de actividad anticomplementaria de los sueros, debida posiblemente a complejos antígeno-anticuerpo circulantes. Por lo general los pacientes registran la presencia de anticuerpos contra antígenos hepáticos normales, pero estos no aumentan y el título es muy inferior al que se encuentra en las pruebas realizadas con antígenos de hepatitis A. El anticuerpo de hepatitis A que se mide en la prueba de inmunoaderencia casi siempre aparece más tarde que el anticuerpo de FC y su título es mucho más elevado. Los resultados de las pruebas de anticuerpos neutralizantes de hepatitis A concuerdan con los de las pruebas de FC y de IA. En la figura 8 se representan,

FIGURA 7—Títulos de anticuerpos de FC e IA de hepatitis A y valores de anticuerpos neutralizantes, caso de hepatitis A de Costa Rica No. 068-330-08.

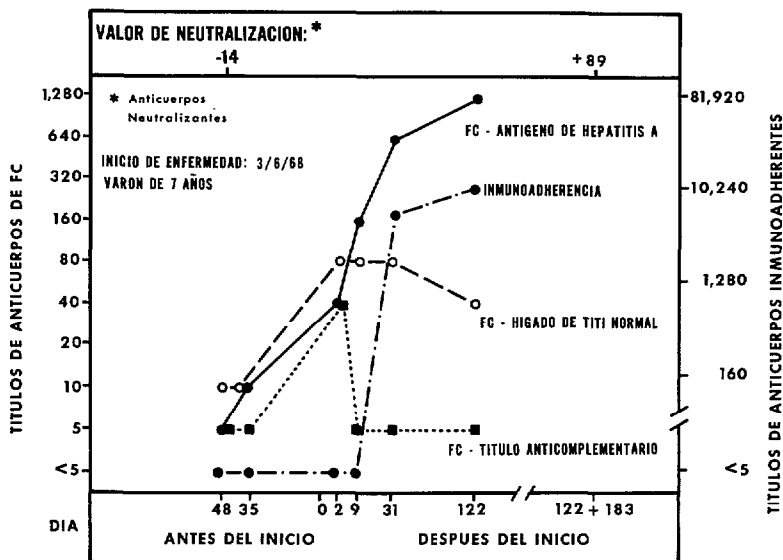
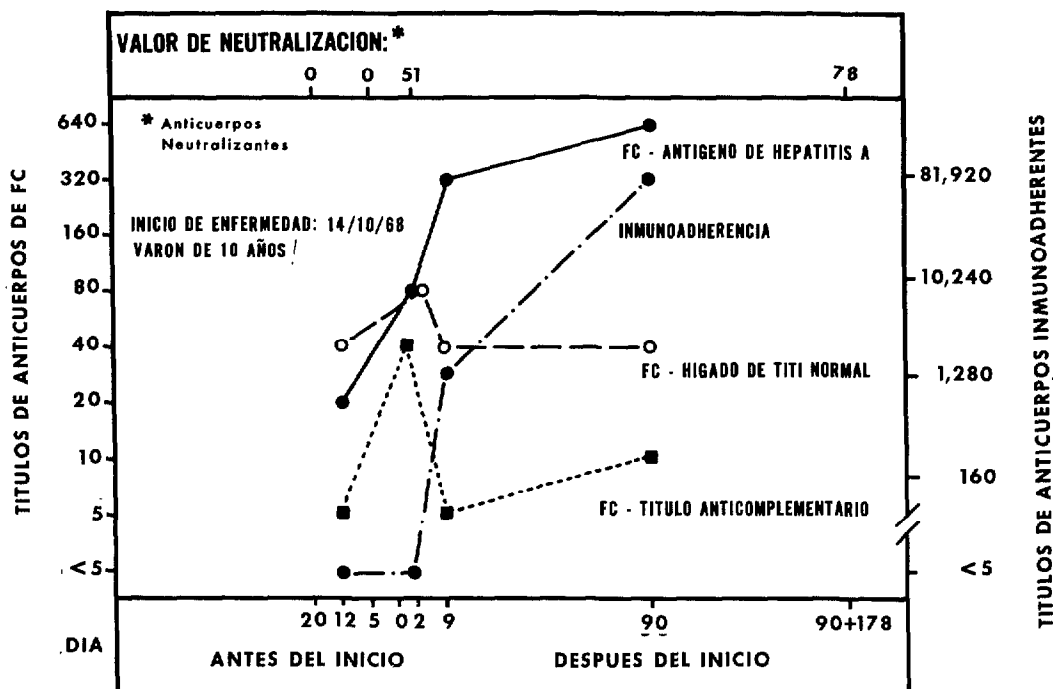




FIGURA 8—Títulos de anticuerpos de FC e IA de hepatitis A y valores de anticuerpos neutralizantes, hepatitis A de Costa Rica, caso No. 204-538-11.



con fines ilustrativos, resultados similares en un segundo caso de hepatitis A humana.

En el cuadro 2 figuran los hallazgos serológicos en tres casos de hepatitis A humana y dos de hepatitis B. Se observa claramente el desarrollo de anticuerpos inmunoaderentes, de fijación del complemento y neutralizantes en los casos de hepatitis A, pero no en los de hepatitis B.

Estos resultados son típicos de los que se observan en las pruebas realizadas hasta la fecha con 27 casos de hepatitis A y 12 de hepatitis B estudiados por nosotros. Las pruebas para observar la persistencia de los anticuerpos de IA y FC de hepatitis A mostraron que los anticuerpos se retenían por lo menos durante siete años, el período más largo de ensayo, sin que se experimentaran cambios sustanciales de nivel. Es importante señalar que la absorción repetida de suero de hepatitis A humana con antígeno hepático de

monos títi normales no eliminó los anticuerpos de FC y de IA de hepatitis A, y la sustitución de antígeno de hepatitis A por antígeno hepático normal en la prueba IA dio resultados serológicos negativos. En las pruebas mencionadas, se registró el desarrollo de complejos inmunitarios de virus de hepatitis A CR326 con suero de hepatitis A humana de un convaleciente, según lo revelado por inmunomicroscopia electrónica.

Durante los estudios epidemiológicos de la hepatitis A y B en siete familias de Costa Rica, se localizaron 18 casos de hepatitis A y nueve de hepatitis B. Cabe destacar que ocho de los nueve casos de hepatitis B eran clínicamente evidentes, mientras que, por comparación, solo 11 de los 18 (61%) de los casos de hepatitis A eran aparentes desde el punto de vista clínico. Por lo tanto, la hepatitis A resultó ser la menos grave de las dos enfermedades.

CUADRO 2—Hallazgos<sup>a</sup> de la prueba de inmunoadherencia, fijación del complemento y neutralización del suero en casos de hepatitis A y B.

Títulos de anticuerpos de hepatitis A				
Caso No.	Muestra de suero	Immuno-adherencia	Fijación del complemento	Valor de neutralización
<u>Casos de hepatitis A</u>				
08	Antes del inicio	< 5	5 o <	-14
	Después del inicio	10,240	1,280	89
11	Antes del inicio	< 5	20 o <	0
	Después del inicio	81,960	640	78
07	Antes del inicio	< 5	10 o <	18
	Después del inicio	25,600	640	89
<sup>b</sup> <u>Casos de hepatitis B</u>				
01	Antes del inicio	< 5	20 o <	
	Después del inicio	< 5	20 o <	
05	Antes del inicio	640	40	50
	Después del inicio	640	40	67

<sup>a</sup> Estos hallazgos son típicos de las pruebas realizadas en 16 casos de hepatitis.

<sup>b</sup> Se detectó AgHB<sub>s</sub> en todos los casos de hepatitis B.

Se supone que las pruebas IA y FC serán muy útiles para aclarar el enigma de la epidemiología de la hepatitis A humana. El cuadro 3 presenta los resultados más sobresalientes de un estudio epidemiológico de la hepatitis A y B en una familia de Costa Rica. Los hallazgos coinciden con los de estudios de siete brotes familiares examinados hasta la fecha. El sujeto de nueve años, que según se creía era el caso índice de hepatitis A, resultó ser en efecto un caso de hepatitis B que ocurrió en un niño inmune a la hepatitis A. El sujeto de cuatro años experimentó hepatitis A en abril y, al poco tiempo, el sujeto de cinco años tuvo hepatitis A. Los sujetos de 7, 10, 13, 14 y 40 años eran todos inmunes a la hepatitis A y no

padecieron la infección. El niño de dos años, si bien era susceptible, escapó a la infección y, de manera sorprendente, también la madre, de 37 años. Ambos sujetos, sin embargo, tenían anticuerpos IA y FC de hepatitis A cuando fueron sometidos a análisis siete años más tarde. Estos hallazgos concuerdan con el concepto general de que la hepatitis A tiende a ser una enfermedad de personas jóvenes en países como Costa Rica en los que la enfermedad es epidémica.

En el cuadro 4 figuran los resultados de las pruebas para verificar la presencia de anticuerpos IA de hepatitis A en personas adultas en diversos grupos de población de los Estados Unidos, comparados con personas adultas de familias costarricenses. Solo

CUADRO 3—Brote de hepatitis A y B en una familia, Costa Rica, 1967.

Edad sujeto (años)	Fecha inicio enf.	Serología de la hepatitis A		Hep. B anti- genemia	Diagnóstico
		Immuno- ad.	Fij. del complemento		
9	2 de marzo	Immune	Immune	+	Hepatitis B
4 <sup>a</sup>	20 de abril	Aumento	Aumento	0	Hepatitis A
5 <sup>a</sup>	2 de mayo	Aumento	Aumento	0	Hepatitis A
2 <sup>b</sup>	Sano	Susceptible	Susceptible	0	Sano
37 <sup>b</sup>	Sano	Susceptible	Susceptible	0	Sano
40	Sano	Immune	(?)	0	Sano
14	Sano	Immune	Immune	0	Sano
13	Sano	Immune	Immune	0	Sano
10	Sano	Immune	Immune	0	Sano
7	Sano	Immune	Immune	0	Sano

<sup>a</sup> El sujeto de 4 años era anictérico y el de 5 años era subclínico. Todos tuvieron aumento de enzimas en el diagnóstico.

<sup>b</sup> Estos sujetos habían desarrollado anticuerpos de FC e IA de hepatitis A cuando se les examinó siete años más tarde.

el 27% del personal adulto que trabaja en la Compañía Merck en West Point, Pennsylvania, tenía anticuerpos de hepatitis A, y solo el 33% de los donantes de sangre en Arizona resultó positivo serológicamente. En contraste, cerca del doble de los presos de

una penitenciaría de Oklahoma era seropositivo y, en Costa Rica, el 85% de las personas adultas analizadas tenía anticuerpos de hepatitis A. En otros estudios no consignados en este trabajo, se encontró que por lo menos el 90% de los niños de Costa Rica

CUADRO 4—Títulos de inmunoadherentes de hepatitis A en adultos normales.

Título IA	No. de personas con título			
	Trabajadores (West Point, Pa.)	Don. banco sangre (Arizona)	Presos (Oklahoma)	Miembros de la familia (Costa Rica)
<10	83	22	10	2
10	1	0	0	
20	0	0	0	
40	0	1	1	
80	2	1	0	
160	1	1	4	1
320	5	1	0	1
640	7	1	8	5
1,280	4	2	0	4
2,560 o <	10	4	3	
No. de positivos/total	30/113	11/33	16/26	11/13
% positivos	27	33	62	85

tenía anticuerpos de hepatitis A al llegar a los 15 años. Esto señala la notable diferencia entre la manifestación de la hepatitis A entre poblaciones de Costa Rica comparadas con las estadounidenses.

Las inmunoglobulinas humanas que se producen en el comercio y que se utilizan para el tratamiento de la hepatitis A pueden variar considerablemente en cuanto a título de anticuerpo, según se muestra en el cuadro 5. La mayoría de los lotes, sin embargo, tenían un título de 1:4000 ó 1:8000. El desarrollo de la prueba IA permite la estandarización precisa del contenido de anticuerpos.

#### Vacuna contra la hepatitis B (11)

Si bien los títes no son susceptibles al virus de la hepatitis B, estos han sido de suma importancia en los trabajos destinados a elaborar una vacuna contra la hepatitis B, ya que han servido para evaluar la inocuidad de la vacuna en cuanto a la ausencia de virus vivos de hepatitis A. En este examen por lo tanto, el papel del mono títe merece mención especial.

El desarrollo de la vacuna de hepatitis B, se basa en el hecho de que ciertos sujetos humanos pueden propagar cantidades considerables de antígeno australiano (conocido hoy día como antígeno superficial de la hepatitis B, AgHB<sub>s</sub>), que evidentemente es el

antígeno glicoproteico superficial del virus de la hepatitis B (partícula de Dane) y es el antígeno importante para estimular la inmunidad contra el virus. Krugman et al. (21) han utilizado estos conocimientos y han preparado una vacuna en la cual el plasma diluido hervido de un portador de antígeno australiano estimuló anticuerpos en sujetos humanos y los protegió contra la enfermedad. La vacuna de hepatitis B que se elabora en nuestros laboratorios consiste en una preparación inactivada, altamente purificada de antígeno superficial de hepatitis B, antigénicamente activa, libre de toda infectividad vírica detectable y constituida en forma tal que pueda usarse en pruebas con seres humanos. La purificación del antígeno del virus se logra principalmente mediante dos ciclos de formación de bandas isopénicas y separación zonal, seguidos de otros procedimientos químicos para obtener un producto altamente purificado. El antígeno purificado en el producto final es ajustado a una concentración de 20 µg/ml de proteína (Lowry) y tratado durante 72 horas a 36°C con formalina a una concentración de 1:4000.

La vacuna fue ensayada para determinar si estaba libre de contaminantes víricos y microbianos viables, mediante la esterilidad microbiana ordinaria, el cultivo celular y otros procedimientos en animales. Se realizaron pruebas adicionales en títes para verificar la infectividad por virus de la hepatitis A y en chimpancés para la de hepatitis B. Todas las pruebas dieron resultados satisfactorios.

Las pruebas de actividad antigénica de la vacuna se realizaron con cobayos. Los resultados que figuran en el cuadro 6 muestran que solo 2.0 µg de antígenos indujeron anticuerpos de hepatitis B después de una dosis única de vacuna, y solo se requirió una dosis de 0.5 µg cuando se suministraron tres dosis de vacuna. Los títulos medios de anticuerpos fueron progresivamente menores a medida que se reducía la dosis de antígeno. El cuadro 7 resume los resultados de pruebas

CUADRO 5—Distribución, títulos inmunoadherentes de hepatitis A, 24 lotes comerciales de inmunoglobulina humana MSD.<sup>a</sup>

Título IA	No. de lotes
1,000	1
2,000	2
4,000	11
8,000	9
16,000	1

<sup>a</sup> Merck Sharpe and Dohme.

CUADRO 6—Estudios de actividad realizados en cobayos después de la administración del lote 559 de vacuna inactivada de hepatitis B.

Dosis (vac.) ( $\mu$ g)	Reacción de anticuerpos de hemaglutinación pasiva (Ausure) <sup>a</sup> después de la dosis					
	1		2		3	
	Conversión	Título medio	Conversión	Título medio	Conversión	Título medio
20	12/14	127	10/11	101	10/10	75
4	7/12	9	7/8	36	8/8	52
2	7/14	3	5/11	7	10/10	46
1	4/13	2	5/8	8	8/8	37
0.5	2/14	1	3/14	2	10/12	20

Las dosis se administraron por vía subcutánea a los 0, 14 y 56 días.

<sup>a</sup> Ausure (PHA, electronucleónica).

en que se inmunizaron chimpancés. Cuatro de los seis chimpancés desarrollaron anticuerpos después de una dosis única de vacuna de 20  $\mu$ g. Cinco de los seis animales habían desarrollado anticuerpos después de administrárseles tres dosis. También se muestran los títulos de anticuerpos en cada uno de los animales. Los cercopitecos verdes también desarrollaron anticuerpos después de ser vacunados.

Actualmente se están realizando estudios para probar la eficacia protectora en un ensayo controlado de chimpancés, y de los primeros resultados se deduce que la vacuna ofrece buena protección. Todas las pruebas indican que la vacuna purificada de hepatitis

B es activa, inocua y apropiada para ser ensayada en el hombre.

#### Conclusiones

No cabe duda que los progresos registrados en las investigaciones en los últimos tres años han dado lugar a descubrimientos importantes tanto en lo que se refiere a la hepatitis A como a la hepatitis B. Hoy día se puede estudiar la hepatitis A en el laboratorio en un modelo animal satisfactorio y realizar pruebas de neutralización del suero en estas especies de animal. Además, existen valoraciones simples *in vitro* de inmunoadherencia y fijación del complemento para el antígeno y anticuerpo de la hepatitis A. Por

CUADRO 7—Reacción de anticuerpos en chimpancés después de la administración del lote 559 de vacuna inactivada de hepatitis B.

Animal No.	Anticuerpo de hepatitis B (Ausab) <sup>a</sup> según la dosis administrada				Título a las 16 semanas (después de 3 dosis)
	0	1	2	3	
837	0	+	+	+	72
833	0	+	+	+	72
834	0	+	+	+	208
832	0	+	0	+	32
835	0	0	0	+	72
836	0	0	0	0	<8

Dosis (20  $\mu$ g) administradas por vía subcutánea a las 0, 4 y 8 semanas.

<sup>a</sup> Ausab (RIA, Abbott).

último, se han descrito las características del virus de la hepatitis A que la sitúan en la familia de los virus picorna, los cuales se parecen más a los enterovirus.

Esos adelantos son de gran importancia, no solo por lo ya realizado, sino también por las posibilidades que crean para las investigaciones futuras y para su aplicación en la hepatitis humana. Las perspectivas más importantes para el futuro son las siguientes: a) la aplicación de la prueba de inmunoadherencia al diagnóstico serológico de rutina de la hepatitis; b) la realización de estudios epidemiológicos sobre la hepatitis dirigidos a medidas específicas de control y prevención de la enfermedad; c) la introducción, para uso general, de la inmunoglobulina humana, que ha sido estandarizada precisamente en relación con el contenido de anticuerpos de hepatitis A; d) el uso de monos tití en el control de la inocuidad de la vacuna para la hepatitis B ya preparada, y finalmente, e) la elaboración de medios para el cultivo de virus de hepatitis A humana en el laboratorio, con objeto de obtener una vacuna contra la hepatitis A. En esta tarea, los tejidos de tití sin duda serán esenciales para la adaptación del cultivo celular, y el propio tití lo será también para pruebas de inocuidad y eficacia de la vacuna antes de someterla a experimentos en el ser humano.

La posibilidad de que se logren o no estos otros adelantos depende en este momento de la disponibilidad de títes para los estudios. Además, estos adelantos dependen de la disponibilidad de una especie particular de títes, *Saguinus mystax* (de bigote blanco) que, como se indica en el cuadro 8, es la única especie de tití que se sabe es sumamente susceptible al virus.

Los embargos que varios países han impuesto en tiempos recientes a la exportación de títes han conducido a una interrupción casi completa de las investigaciones sobre la hepatitis A. Con todo, estos embargos eran necesarios para poder levantar un censo de títes en sus habitats originales y evaluar la rapidez con que se pueden reponer en la

CUADRO 8—Comparación de la susceptibilidad de las especies *mystax*, *nigricollis* y *oedipus* a la cepa CR355 de hepatitis A.

Semana después de la inoculación del virus	Especie--No. de positivos de acuerdo con el tiempo		
	<i>S. mystax</i> (10 animales)	<i>S. nigricollis</i> (12 animales)	<i>S. oedipus</i> (11 animales)
0	0	0	0
4	4	0	0
5	4	0	0
6	5	1	0
7	7	3	0
8	7	4	0
9	8	4	1
10	8	4	2

naturaleza, a fin de que no se conviertan en especies amenazadas. Cabe confiar que los problemas de regulación del suministro y la reproducción puedan resolverse en un futuro próximo y que, al menos a corto plazo, el número total relativamente pequeño de animales que se precisan para el progreso en la esfera de la salud humana puedan destinarse a dicho uso. El problema a largo plazo del suministro de títes—bien mediante una reproducción controlada en sus habitats originales o mediante programas de cría, o una combinación de ambas fuentes—merece atención muy seria en este momento, ya que los problemas de la hepatitis A y B están en vías de solución.

#### Resumen

Gracias al tití de bigote blanco (*S. mystax*) se han logrado importantes adelantos en las investigaciones de la hepatitis A humana. El virus de la hepatitis A es un agente que tiene características similares a los enterovirus y que se puede propagar en los títes. El animal y sus tejidos infectados permiten la realización de ensayos *in vivo* e *in vitro* relativos al virus, al antígeno y al anticuerpo de la hepatitis A. Estos adelantos son muy promisorios para el futuro, e incluyen el diagnóstico de la hepatitis A, procedimientos de laboratorio de rutina, investigaciones epidemiológicas de la en-



fermedad, la introducción de inmunoglobulina humana de actividad uniforme para la hepatitis A, el desarrollo de medios para propagar el virus de la hepatitis A en cultivos celulares con fines de vacunación y el control de la prueba de inocuidad de la vacuna de hepatitis B existente. Los problemas de la hepatitis A humana parecen es-

tar en vías de solución, pero esto depende en gran medida de la disponibilidad de títulos para estudios de investigación. Es menester prestar seria atención al suministro de títulos a largo y corto plazo para permitir la continuación de las investigaciones, asegurando a la vez el mantenimiento de la especie en la naturaleza. □

## REFERENCIAS

- (1) Mascoli, C. C., O. L. Ittensohn, V. M. Villarejos, G. J. A. Arguedas, P. J. Provost y M. R. Hilleman. Recovery of hepatitis agents in the marmoset from human cases occurring in Costa Rica. *Proc Soc Exp Biol Med* 142:276-282, 1973.
- (2) Provost, P. J., O. L. Ittensohn, V. M. Villarejos, G. J. A. Arguedas y M. R. Hilleman. Etiologic relationship of marmoset-propagated CR326 hepatitis A virus to hepatitis in man. *Proc Soc Exp Biol Med* 142:1257-1267, 1973.
- (3) Hilleman, M. R., P. J. Provost, O. L. Ittensohn, V. M. Villarejos y G. J. A. Arguedas. Etiologic identification of marmoset-propagated CR236 hepatitis A virus. Presentado en: Joint Viral Diseases Conference, U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (23-24 de julio de 1973).
- (4) Hilleman, M. R., P. J. Provost, B. S. Wolanski, W. J. Miller, O. L. Ittensohn y W. J. McAleer. Characterization of CR326 human hepatitis A virus, a probable enterovirus. *Symp Ser Immunobiol Stand* (En prensa.)
- (5) Hilleman, M. R., P. J. Provost, W. J. Miller, V. M. Villarejos, O. L. Ittensohn y W. J. McAleer. Immune-adherence and complement-fixation tests for human hepatitis A. Diagnostic and epidemiologic investigations. *Symp Ser Immunobiol Stand* (En prensa.)
- (6) Provost, P. J., B. S. Wolanski, W. J. Miller, O. L. Ittensohn, W. L. McAleer y M. R. Hilleman. Biophysical and biochemical properties of CR326 human hepatitis A virus. *Am J Med Sci*. (En prensa.)
- (7) Hilleman, M. R., P. J. Provost, W. J. Miller, V. M. Villarejos, O. L. Ittensohn y W. J. McAleer. Development and utilization of complement-fixation and immune-adherence tests for human hepatitis A virus and antibody. *Am J Med Sci*. (En prensa.)
- (8) Provost, P. J., B. S. Wolanski, W. J. Miller, O. L. Ittensohn, W. J. McAleer y M. R. Hilleman. Physical, chemical, and morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326. *Proc Soc Exp Biol Med* 148:532-539, 1975.
- (9) Provost, P. J., O. L. Ittensohn, V. M. Villarejos y M. R. Hilleman. A specific complement-fixation test for human hepatitis A employing CR326 virus antigen. Diagnosis and epidemiology. *Proc Soc Exp Biol Med* 148:961-968, 1975.
- (10) Miller, W. J., P. J. Provost, W. J. McAleer, O. L. Ittensohn, V. M. Villarejos y M. R. Hilleman. Specific immune-adherence assay for human hepatitis A antibody. Application to diagnostic and epidemiologic investigations. *Proc Soc Exp Biol Med* 149:254-261, 1975.
- (11) Hilleman, M. R., E. B. Buynak, R. R. Roehm, A. A. Tytell, A. U. Bertland y G. P. Lampson. Purified and inactivated human hepatitis B vaccine. Progress Report. *Am J Med Sci*. (En prensa.)
- (12) Deinhardt, F., A. W. Holmes, R. B. Capps y H. Popper. Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passages, and description of liver lesions. *J Exp Med* 125:673-688, 1967.
- (13) Holmes, A. W., L. Wolfe, H. Rosenblate y F. Deinhardt. Hepatitis in marmosets: induction of disease with coded specimens from a human volunteer study. *Science* 165:816-817, 1969.
- (14) Holmes, A. W., L. Wolfe, F. Deinhardt y M. E. Conrad. Transmission of human hepatitis to marmosets: further coded studies. *J Infect Dis* 124:520-521, 1971.
- (15) Deinhardt, F., A. W. Holmes y L. G. Wolfe. Correspondence. Hepatitis in marmosets. *J Infect Dis* 121:351-352, 1970.
- (16) Lorenz, D., L. Barker, D. Stevens, M. Peterson y R. Kirschstein. Hepatitis in the marmoset, *Saguinus mystax*. *Proc Soc Exp Biol Med* 135:348-354, 1970.
- (17) Hillis, W. D. Viral hepatitis: an un conquered foe. *Milit Med* 133:343-354, 1968.
- (18) Parks, W. P. y J. L. Melnick. Attempted isolation of hepatitis viruses in marmosets. *J Infect Dis* 120:539-547, 1969.
- (19) Parks, W. P., J. L. Melnick, W. R. Voss, D.

- B. Singer, H. S. Rosenberg, J. Alcott y A. M. Casazza. Characterization of marmoset hepatitis virus. *J Infect Dis* 120: 548-559, 1969.
- (20) Maynard, J. E., D. W. Bradley, C. R. Gravelle, C. L. Hornbeck y E. H. Cook. Virus-like particles in hepatitis A. *Lancet* 2:1207, 1974.
- (21) Krugman, S., J. P. Giles y J. Hammond. Viral hepatitis, type B (MS-2 strain). Studies on active immunization. *JAMA* 217:41-45, 1971.

### Infectious hepatitis (hepatitis A) research in nonhuman primates (Summary)

A satisfactory animal model has been found for laboratory studies of human hepatitis A—namely, the white-moustached marmoset (*Saguinus mystax*). With this species it has been possible to perform serum-neutralization tests and to develop immune-adherence and complement-fixation tests demonstrating antigen and antibody to the virus. The recent work in marmosets has also led to determination of the agent's characteristics: it most closely resembles the enteroviruses of the picornavirus family.

These advances open the way for development of a routine serologic test for diagnosis of the disease, of a human immune globulin for

general use that would be precisely standardized for hepatitis A antibody, and, ultimately, of a vaccine. They also provide bases for epidemiologic studies that could reveal nonspecific measures for the disease's control. In addition, there is indication that marmosets could be used for safety control of the hepatitis B vaccine that has already been developed.

An adequate supply of *S. mystax*—threatened by recent embargoes on their exportation—is essential to continuation of this work. The question of marmoset supply, both in the short term and over the long range, deserves serious review.

### A pesquisa da hepatite infecciosa (hepatite A) em primatas não humanos (Resumo)

Graças ao sagüi-imperador (*S. mystax*) foram realizados importantes avanços na pesquisa da hepatite A humana.

O vírus da hepatite A é um agente de características semelhantes às do enterovírus e que se pode propagar entre esses sagüis. O animal e seus tecidos infectados possibilitam a realização de ensaios *in vivo* e *in vitro* com o vírus, o antígeno e o anticorpo da hepatite A. Esses avanços, que muito prometem para o futuro, abrangem o diagnóstico da hepatite A, procedimentos rotineiros de laboratório, pesquisas epidemiológicas da doença, a introdução de imunoglobulina humana de ação uniforme para

a hepatite A, o aperfeiçoamento de meios de propagação do vírus da hepatite A em culturas celulares para fins de vacinação e o controle da prova de inocuidade da vacina de hepatite B existente. Os problemas da hepatite A humana parecem estar em vias de solução, mas isso depende em grande parte da disponibilidade de sagüis para atividades de investigação. É preciso considerar seriamente o fornecimento de sagüis a curto e longo prazo a fim de possibilitar o prosseguimento das pesquisas, assegurando por sua vez a manutenção da espécie na natureza.

### Recherche sur l'hépatite infectieuse (hepatite A) chez les primates autres que l'homme (Résumé)

Grâce au titi à moustache blanche (*S. mystax*) des progrès importants ont pu être accomplis dans les recherches sur l'hépatite A chez l'homme. Le virus de l'hépatite A est un agent ayant des caractéristiques identiques aux virus complet et pouvant être communiqué aux titis. Des tests ont pu être réalisés *in vivo* et

*in vitro* sur le virus, l'antigène et l'anti-corps de l'hépatite A sur l'animal et sur ses tissus infectés. Ces études s'avèrent très prometteuses pour l'avenir et elles comportent le diagnostic de l'hépatite A, les procédures normales de laboratoires, les recherches épidémiologiques de cette maladie, l'introduction d'immuno-

globuline humaine agissant uniformément sur l'hépatite, la mise au point de nouvelles méthodes de culture du virus de l'hépatite en milieux cellulaires en vue d'une vaccination et vérification de l'efficacité du vaccin existant pour l'hépatite B. Les problèmes posés par l'hépatite A chez l'homme semblent sur le point d'être résolus, bien que cela dépende en

grande partie de la disponibilité de titis pour les recherches. Il faut donc accorder une sérieuse attention au maintien de réserves suffisantes de titis, à long et court terme, afin de pouvoir poursuivre les travaux de recherche tout en assurant la survie de l'espèce en milieu naturel.