

La Reoforesis como método para la detección del antígeno asociado a la Hepatitis B

DR. JULIO MORA*

DR. FRANCISCO PEREIRA*

DR. ALBERTO BARRANTES*

RESUMEN

Se hace un estudio comparativo entre la técnica de la reoforesis y el radioinmunoensayo para la detección de antígeno asociado a la hepatitis B en 800 donadores familiares de sangre. Se encontró que la positividad diagnóstica de la reoforesis es de 81% en relación con el radioinmunoensayo, a su vez se pudo demostrar 2.6% y 2.1% de donadores positivos al antígeno, con las técnicas de radioinmunoensayo y reoforesis respectivamente.

Con el uso cada vez mayor de la transfusión de sangre y sus derivados, el peligro de la transmisión de la hepatitis por portadores silenciosos, ha llevado a la necesidad de perfeccionar técnicas de laboratorio capaces de detectar el antígeno asociado a la hepatitis B (AgHBs). Entre estas se encuentran aquellas que se basan en la inmunodifusión (3), en la contraelectroforesis (2), en el radioinmunoensayo (RIA) (10), en la inhibición de la aglutinación de partículas de carbón (12), en la reoforesis (RF) (9), en la fijación de complemento (11) y en la hemaglutinación pasiva inversa (6).

La efectividad de cada prueba ha sido medida en base al número de muestras positivas detectadas en una población, y como

resultado de esta evaluación, la inmunodifusión, la primera desarrollada y la menos sensible fue reemplazada por la contraelectroforesis que es diez veces más sensible; y a su vez la hemaglutinación pasiva inversa y el radioinmunoensayo demostraron ser 100 veces más sensibles que la contraelectroforesis (4,5).

El uso de la sangre y de sus derivados, por otra parte, ha llevado a la aparición de diferentes tipos de donadores; el donador profesional que es aquel que recibe pago por su donación, el donador familiar que dona la sangre para un familiar o para un amigo, y el donador altruista que dona su sangre como un acto de solidaridad con la sociedad a la que pertenece.

Entre las principales características distintivas de las técnicas mencionadas arriba, están la sensibilidad, la especificidad, la rapidez y la facilidad de ejecución y el costo; por lo tanto es nuestro interés en el presente trabajo evaluar una técnica para la detección del antígeno asociado a la hepatitis B, la reoforesis y compararla con el radioinmunoensayo; y a la vez, hacer una encuesta sobre la positividad del AgHBs en donadores familiares del Hospital México.

La reoforesis es una técnica de inmunodifusión en que una modificación simple induce al suero —colocado en hoyos periféricos—, a difundir únicamente hacia el centro donde se encuentra el anticuerpo, más que a difundir en forma radial; lo que resulta en un aumento de la sensibilidad.

* Laboratorio de Investigación Clínica, Hospital México, C. C. S. S.

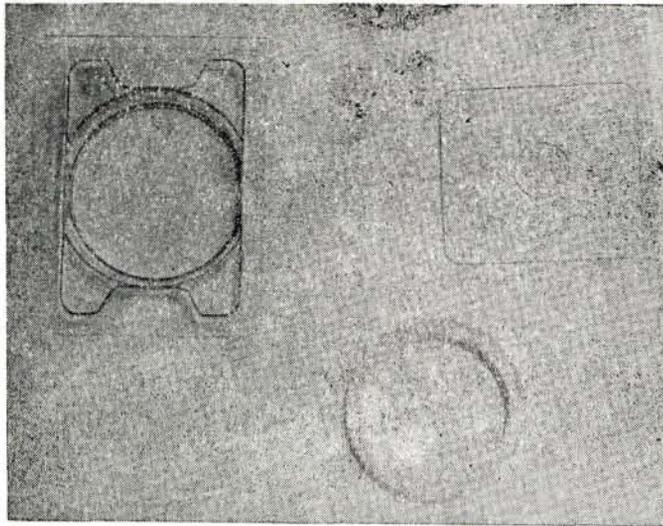


FIGURA 1

Cámara de la Abbott para reoforesis, incluye: cámara, anillo y tapa con orificio central.

En el agar, el patrón de colocación hexagonal de los hoyos con los sueros en estudio, se rodea por un canal circular, dentro del cual se coloca el tampón. Se cubre la placa con una tapa de plástico que posee un orificio central sobre el hoyo del anticuerpo —lo que promueve la evaporación del agar en este punto—, produciendo una corriente de la periferia hacia la parte central, dentro del gel, que arrastra consigo el suero de los hoyos periféricos. Por esta razón, los componentes del suero llegan en concentraciones más altas al hoyo del anticuerpo, en contraste con la inmunodifusión corriente, donde las concentraciones del suero se diluyen, pues difunden hacia todas direcciones.

Materiales y métodos

Se tomaron sueros de 800 donadores familiares del Banco de Sangre del Hospital México y se estudiaron por dos métodos para detectar la presencia de antígeno asociado a la hepatitis B: Ausria II (Abbott Laboratories) y la técnica de la reoforesis (9) con algunas modificaciones.

Soluciones madre de tampón de Prince:
 Solución NaCl 2M: 117 g NaCl, agua destilada csp 1 litro. Solución Tris 1M: 14 g Tris, agua destilada csp 1 litro. Solución EDTA 0.05 M: 18.6 g EDTA, agua destilada csp 1 litro.

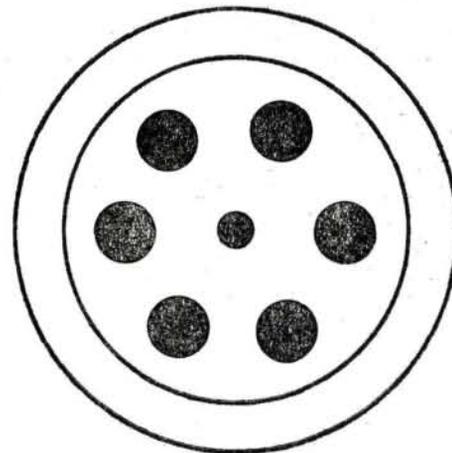
Solución de trabajo: NaCl 2M 50 ml, Tris 1M 10 ml, EDTA 0.05 M 20 ml, agua destilada csp 1 litro. Ajustar a pH 7.6 con

HCL 1N. Antisuero anti-antígeno australiano, cedido por el ICMRT. Agarosa (Behringwerke) al 0.85% en tampón de Prince.

Las placas con 1.6 ml de agarosa se pueden preparar en pequeñas placas de petri de 35 mm de diámetro o en las cámaras de Abbott; ambas con un anillo de 25 mm de diámetro interno y 3 mm de grosor colocado dentro de la cámara. Fig. 1.

Hacer 6 hoyos de 4.5 mm de diámetro, formando un hexágono alrededor de un hoyo de 2.5 mm de diámetro. Fig. 2.

FIGURA 2



Colocación hexagonal de los hoyos con los sueros en estudio, alrededor del hoyo central con el antisuero.

Una vez que estén listas las placas, quitar el anillo y colocar los sueros en estudio en los hoyos periféricos, el antisuero en el hoyo central y el tampón de Prince en el canal del anillo. Colocar la tapa e incubar a temperatura ambiente por 18 horas. Al cabo de este tiempo revisar la formación de una línea de precipitación entre el hoyo de muestra y el antisuero.

Resultados

De los 800 donadores familiares estudiados, 27 dieron positiva la prueba con RIA y 17 con la técnica de la reoforesis, con la salvedad de que 2 donadores dieron positivos con la RF y negativos con RIA, pero cuando se repitió la prueba se encontró que eran positivas con RIA.

El porcentaje de positividad diagnóstica de la RF es de 81%, tomando el RIA como 100%, pero teniendo en cuenta que el RIA tiene una sensibilidad alta y una especificidad baja.

A su vez el porcentaje de donadores familiares positivos por AgHBs fue 2.6% con el método de RIA y de 2.1% con el método basado en la RF.

Discusión

La mayoría de los individuos positivos por AgHBs caen dentro de dos categorías, o poseen una hepatitis crónica o son los llamados portadores silenciosos. Sin embargo, el término portador silencioso es en alguna forma peligroso, ya que investigaciones en ellos pueden revelar compromiso hepático en muchos individuos aparentemente normales (1). De hecho, la habilidad de desarrollar infección puede depender de que la respuesta a ella no es normal en el caso de los portadores y existir una relación simbiótica virus-huésped. Esta simbiosis puede resultar por la incapacidad del individuo en reconocer el antígeno y por otro lado por producción de tolerancia (1).

La existencia de este tipo de individuos, hace necesario el estudio de todo donador de sangre para evitar la transmisión de la hepatitis en individuos que sí son capaces de desarrollarla, aunque es bien conocida la transmisión por medio de otros mecanismos (8, 10).

El porcentaje de individuos positivos de AgHBs dentro de los donadores familiares

de nuestro estudio, resulta bastante bajo, lo que nos hace enfatizar que la detección del antígeno es de gran valor en el estudio de los donadores de sangre, pero que la reducción de la hepatitis post-transfusional se logra únicamente con la eliminación de los donadores profesionales, ya que en general, el riesgo de contraer hepatitis es de 3 a 5 veces mayor cuando la sangre procede de un donante remunerado en vez de un donante voluntario (7).

Los resultados obtenidos con la RF son halagadores pues ha demostrado gran sensibilidad en la detección de individuos con AgHBs, además de que combina la simplicidad y rapidez de la inmunodifusión.

Tomando en cuenta que en este país es muy poca la sangre que se transfunde con prueba para antígeno asociado a la hepatitis B —especialmente fuera de San José—, creemos que este es un método práctico, sencillo, de poco costo, que no requiere equipo especial y que por lo tanto puede ser desarrollado en los bancos de sangre de cualquier hospital del país, y así poder estudiar los componentes sanguíneos con anterioridad a la transfusión, con el objeto de prevenir —esperanzadoramente—, en forma significativa el grado de morbilidad y mortalidad relacionado con la hepatitis B.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—ALMEIDA, J.D., WATERSON, A.P.:
Hepatitis B antigen —An incomplete history— *Am. J. Med. Sci.* 270: 105, 1975.
- 2.—ALTER, H. J., HOLLAND, P.V., PURCELL, R. H.:
Counterelectrophoresis for detection of hepatitis associated antigen. Methodology and comparison with gel diffusion and complement fixation.
J. Lab. Clin. Med. 77: 1000, 1971.
- 3.—BLUMBERG, B.S., ALTER, H. J., VISNSCH, S. A.:
A "new" antigen in leukemia sera.
JAMA. 191:541, 1965.
- 4.—DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE:
Test for hepatitis associated (Australia) antigen; notice of proposal rule making.
Fed. Reg. 39: 25233, 1974.
- 5.—DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE:
Test for hepatitis B surface antigen *Fed. Reg.* 40: 29706, 1975.

- 6.—HIRATA, A.A., EMERICK, A.J., BOLEY, W.F.:
Hepatitis B virus antigen detection by reverse passive hemagglutination.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143:761, 1973.
- 7.—LIGA DE SOCIEDADES DE LA CRUZ ROJA:
La hepatitis, problema mundial, una explicación al alcance de todos.
Transfusión. 11, 1976.
- 8.—MOSLEY, J.W.:
The epidemiology of viral hepatitis: an overview. Am. J. Med. Sci. 270: 253, 1975.
- 9.—PETERS, R. L.:
B surface antigen shows transmission of he-
Rheophoresis. IN Manual for hepatitis B
antigen testing. Ed. Ashcavai and Peters. W.
B. Saunders Co. N.Y., pag. 99, 1973.
- 10.—PETERS, C.J., PURCELL, R.H., LANDER, J.J.,
JOHNSON, K.M.:
Radioimmunoassay for antibody to hepatitis
patitis B surface antigen shows transmission
of hepatitis B virus among household con-
tacts. J. Inf. Dis. 134:218, 1976.
- 11.—PURCELL, R.H., HOLLAND, P.V., WALSH,
J.H., WONG, D.C., MORROW, A.G., CHA-
NOCK, R.M.:
A complement fixation test for measuring
Australia antigen and antibody.
J. Infect. Dis. 120:383, 1969.
- 12.—STEVENS, R.W., MCQUILLAN, G., DENCE,
D. KELLY, J.:
Hepatitis B antigen Card test III. Sensitivity
and specificity Am. J. Clin. Path. 66:59,
1976.