

REOFORESIS

(LA REOFORESIS EN LA DETECCION SERICA DEL ANTIGENO AUSTRALIA)

*Marietta Chacón Ulate**

*Carmen Ma. Sáenz Sánchez**

INTRODUCCION

La reoforesis (Rheo: corriente; Phoresis: transportado) es una técnica ventajosa de difusión en gel, que se utiliza para la detección de algunos marcadores relacionados con la Hepatitis B. Una simple modificación a las técnicas convencionales de difusión favorece la migración del suero desde los huecos periféricos de un modelo hexagonal, hacia el anticuerpo colocado centralmente. Como resultado se obtiene un aumento en la sensibilidad en relación a las técnicas de inmunodifusión convencionales. En la reoforesis, el modelo hexagonal del gel está rodeado por un foso, dentro del cual se pone un tampón. El plato de agarosa es cubierto por una tapa o cubierta de plástico con un agujero en la parte central, ubicado directamente sobre el foso donde se coloca el anticuerpo. Esta disposición facilita, mediante la evaporación, un flujo centrípeto de la solución tampón y el arrastre desde la periferia del suero de los huecos. Esta técnica es altamente satisfactoria en las siguientes situaciones: 1. En los laboratorios donde se debe efectuar amplios tamizajes de muestras. 2. Para determinar subtipos de antígenos donde son buscadas líneas.

Dos tipos de virus (denominados "A" y "B") han sido identificados como agentes etiológicos específicos de la hepatitis, los cuales fueron originalmente identificados en base a sus características epidemiológicas, las cuales se asumieron como completamente distintas. Estudios intensivos han conducido a la caracterización de estos virus y al desarrollo de pruebas de laboratorio específicas para identificar algunos de sus componentes antigénicos y sus correspondientes anticuerpos. Otros agentes presumiblemente virales, todavía no bien caracterizados, son también reconocidos como causantes de hepatitis y se les denomina como tipo no A, no B. En virtud de la dificultad para la diferenciación entre estas formas de hepatitis según los hallazgos bioquímicos, han asumido gran importancia las pruebas serológicas específicas (15).

HEPATITIS B

En 1964 Blumberg y sus colaboradores detectaron un agente en suero, que posteriormente Prince relaciona con el virus de la hepatitis B (IC) y lo denominó Antígeno Australia, el cual se presenta como partículas de dos formas: esféricas y tubulares de diámetros comprendidos entre 19 y 22 nm (18). Dane encontró la verdadera partícula del virus de la hepatitis B, compuesto por ADN, una nucleocápside de 27 nm rodeada por una cubierta exterior de lipoproteínas. Esta cubierta exterior, originalmente descrita como Antígeno Australia y hoy día generalmente conocido como Antígeno de Superficie de la Hepa-

* *Laboratorio Clínica Seguro Social, Juntas de Abangueres.*

** *Laboratorio Clínico Hospital San Rafael de Alajuela, C.C.S.S.*

titis B (HB_sAg). La cápside difiere inmunológicamente del core, al cual se le conocen tres componentes: Antígeno core (HB_cAg), antígeno "e" (HB_eAg) y la ADN polimerasa. Las partículas Core se replican en el núcleo del hepatocito mientras que el HB_sAg es producido en el citoplasma de la célula infectada (15). La partícula Dane está normalmente determinada por la ADN polimerasa, o el factor "e", ambos pertenecientes al Core (18). La infección por virus de la hepatitis B, implica la aparición del antígeno de superficie (HB_sAg) en el suero durante el período de incubación (2 a 8 semanas) antes que cualquier evidencia bioquímica o clínica de disfunción del hígado. Este antígeno persiste durante la fase aguda de la enfermedad. En antígeno Core y su respectivo anticuerpo (ante HB_c) es encontrado en el suero dos o cuatro semanas después de la aparición del HB_sAg, permaneciendo detectable su anticuerpo (anti Core) desde la fase temprana aguda de la enfermedad hasta por muchos años o durante toda la vida. Posterior a la aparición del anti Core, encontraron las anti HB_c y luego las anti HB_sAg, estos últimos asociados con la inmunidad a reinfección. El estado de portador es caracterizado serológicamente por la persistencia de HB_sAg. (15).

TRANSMISION DE LA HEPATITIS B

Se destacan como métodos de transmisión de hepatitis B, la contaminación por secreciones (por ejemplo saliva), así como los procedimientos quirúrgicos y dentales, la inyección de drogas las inmunizaciones en masa, la contaminación por objetos y la transfusión sanguínea. La contaminación por mosquitos hematófagos es señalada como otra posible vía (15). Como métodos de protección contra el virus de la hepatitis B, además de las medidas sanitarias, se dispone actualmente de globulina hiperinmune y recientemente la primera vacuna comercial. (15).

REALIDAD NACIONAL

Al descubrir el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HB_sAg) y dada su especificidad serológica, se ha hecho posible la identificación de los donadores que pueden transmitir la enfermedad a los receptores seronegativos susceptibles. El Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico (L.S.U.—I.C.M.R.T.) ha realizado continuos trabajos epidemiológicos y colaborado con unidades existen-

ciales para el diagnóstico de hepatitis a través de costosos programas de investigación, que han permitido a nuestro medio disponer, entre otros beneficios, de modernas facilidades diagnósticas como: HB_sAg (reoforesis y RIA), antígeno "e"; anticuerpos "e", anticuerpos para Hepatitis B, hemaglutinación, inmunoadherencia para determinación de anticuerpos para hepatitis A, ELISA para antígeno Australia, etc. El ICMRT brinda servicios de tamizaje diagnóstico por HB_sAg al Banco Nacional de Sangre, hospitales del área metropolitana y hospital Carlos Luis Valverde la ciudad de San Ramón, Alajuela. El servicio de diagnóstico masificado del ICMRT para la detección del HB_sAg lo llevan a cabo mediante la técnica de reoforesis, la cual ha sido ampliamente evaluada por ese laboratorio, y nos sirvió para presentar este modelo de análisis, como propuesta de una buena técnica, de bajo costo, factible de ser utilizada en nuestros laboratorios, particularmente de banco de sangre.

HISTORIA

Blumberg y sus colaboradores (Filadelfia, 1964) (4), descubrieron en el suero de un paciente politransfundido afectado de hemofilia, un anticuerpo distinto a los encontrados hasta entonces. Además logró descubrir que dicho Anticuerpo, reaccionaba con el suero de un aborígen Australiano (7), en el que se verificó la presencia de un Antígeno que se denominó Australia (AgAu); el cual es una partícula virus-símil de dimensiones muy reducidas (20 nm) y resistente a altas y bajas temperaturas. Antes se consideraba que eran dos los virus productores de hepatitis: a) Hepatitis infecciosa (IH) conocida como "A" según denominación de la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), el cual presenta un período de incubación de 15 - 40 días. b) Hepatitis sérica (SH) denominado por la O.M.S. como "B", el cual es el responsable de la hepatitis por suero homólogo con un período de incubación de 60-140 días. El Antígeno SH, descrito por Prince, es idéntico al Antígeno Australia (8) presente en algunas hepatitis virales. Desde el hallazgo de Prince, se han encontrado tres tipos de partículas: a) Esféricas, b) Tubulares y c) Dane.

REOFORESIS PARA LA DETECCION SERICA DEL ANTIGENO AUSTRALIA

EQUIPO Y MATERIAL:

1. Discos de agar que pueden ser hechos en pequeñas placas de petri plásticas, colocando un anillo de 2.5 cms de diámetro interior y 3 mm de grueso. El modelo hexagonal es hecho en la isla de Agar que es rodeada por un foso en el que se coloca el tampón. 2. Tapa o cubierta para el plato: puede ser fabricada de plástico claro, con un orificio central de aproximadamente un centímetro de diámetro. 3. Tubos capilares: para el llenado de los huecos con los diferentes sueros. 4. Antígeno positivo (HB_sAg) control. 5. Anticuerpo humano o de carnero anti HB_sAg. 6. Tampón de TRIS - EDTA - NaCl pH 7:6: Pese 18 grs de NaCl y disuelva en 2.000 ml de agua destilada, descarte 50 mls de la solución y agregue los siguientes reactivos al volumen restante: TRIS: 3.66 grs.; EDTA: 6.96 grs; Azida de sodio 0.3 grs; Sulfato de protamina: 0.3 grs, (disuelva por calentamiento). Ajuste el pH a 7.6 con NaOH. HCl. 7. Gel de Agarosa: pese 0.8 grs de agarosa y agréguelo a 100 ml de tampón salino, caliente al baño maría hasta que la agarosa se disuelva. Deposite alícuotas de 15 mls entubos Pyrex de rosca.

PROCEDIMIENTO

1. Coloque 1.8 mls de agarosa fundida en una placa a la que previamente se le coloca el anillo respectivo. 2. Deje edificar. 3. Prepare los huecos correspondientes al modelo hexagonal ubicando 6 huecos periféricamente de 4.5 mm de diámetro para los sueros incógnitas y un agujero central de 2.5 mm para el anticuerpo. 4. Númere los huecos para identificar las muestras. 5. Cuidadosamente desprenda con pinzas el anillo ubicado alrededor del gel. Facilite el desprendimiento del anillo plástico por medio de una espátula plana haciéndola deslizar por su borde interior en la interfase plástico agar. 6. Llene el foso alrededor del gel con el tampón salino. 7. Espere 2-3 minutos y observe los huecos con el fin de comprobar si la agarosa no fue desprendida de la placa en el momento de quitarle el anillo. Si hay tampón en alguno de los huecos se debe descartar la placa. 8. Llene uno de los huecos periféricos con HB_sAg control. 9. Mediante tubos capilares descartables ubique los sueros incógnita en los agujeros periféricos. Llene el agujero

central con el Anti-HB_s. Evite los problemas de difusión por sobrellenado de los huecos. 10. Incube a temperatura ambiente para que el anticuerpo difunda tenuemente. 11. Lea las placas a las 15 - 8 horas de incubación ya que tiempos más prolongados pueden originar un secado excesivo de la agarosa. Debe tomarse en cuenta que muchas de las líneas de antígenos inmunoprecipitantes de la Hepatitis B pueden ser visibles hasta después de 15 - 8 horas. 12. Revise las placas después de 24 horas de incubación, ya que bajos niveles de antígeno pueden ser detectables las siguientes; las líneas de precipitación del antígeno de Hepatitis B en la muestra positiva a las 15-8 horas, se intensifican generalmente facilitando su lectura a las 24 horas.

RESULTADOS

La técnica mostró excelente reproductividad, tanto cuando el suero se inoculó repetidamente en la misma placa (más de dos veces), como en otra placa: cuarenta muestras analizadas para valorar la precisión del procedimiento (diez negativos, treinta positivos por HB_sAg) mostraron absoluta correlación de resultados.

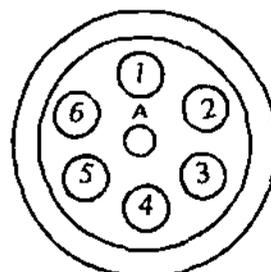


FIGURA 1

Placa de Agarosa y su modelo hexagonal para reoforesis (A), Anillo periférico (B), corresponde al foso para el tampón.

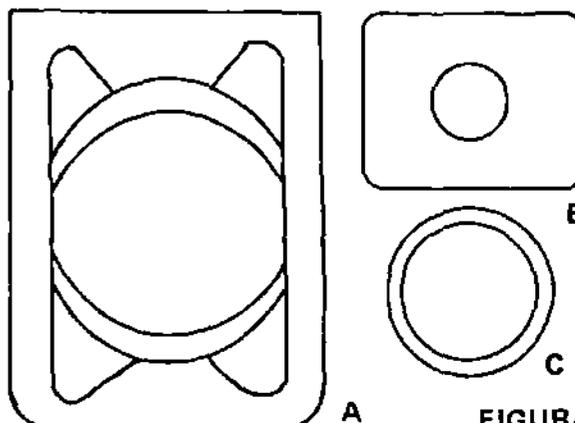


FIGURA 2

Material utilizado en la reoforesis: A. Placa; B. Cubierta; C. Anillo plástico.

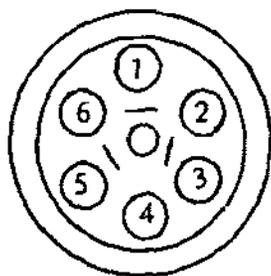


FIGURA 3

Modelo con 2 muestras positivas por HB_sAg. Foso 1 corresponde al control positivo.

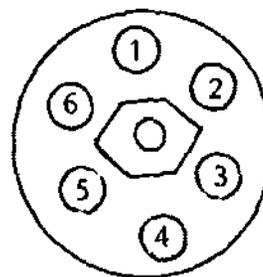


FIGURA 4

Modelo con las 5 muestras positivas. Foso 1 corresponde al suero control positivo.

CUADRO 1

Total de sueros	E.L.I.S.A		Reofóresis		Porcentaje de correlación
	Positivos	Negativos	Positivos	Negativos	
263	51	212	51	212	100o/o

Estudio comparativos de dos métodos para la determinación sérica del HB_sAg

DISCUSION

Los estudios seroepidemiológicos muestran que existen en el mundo cerca de 150 a 200 millones de portadores crónicos de hepatitis B lo que obliga a un tamizaje por HB_sAg a los donadores de Bancos de Sangre. Una progresiva disminución en casos de hepatitis post-transfusión ha sido observada paralelamente al uso de pruebas inmunológicas como la reofóresis, ELISA y RIA. Los métodos considerados más sensibles, como RIA y ELISA pueden restringirse al diagnóstico hospitalario de pacientes sospechosos de sufrir hepatitis mientras que la reofóresis, de satisfactoria sensibilidad y confiabilidad, es la prueba de elección en bancos de sangre, dada su buena simplicidad, bajo costo y satisfactoria sensibilidad. Según múltiples reportes de la literatura científica (1) (2), de estudios comparativos de la técnica de reofóresis con las técnicas mencionadas. La compañía Abbott (Boletín técnico) reporta una mayor sensibilidad para la técnica RIA respecto a la reofóresis, aunque en algunos laboratorios se reporta equivalente sensibilidad (2). Como puede apreciarse en el cuadro número uno, de 263 pacientes analizados en nuestro pro-

cedimiento de investigación, se logrará una absoluta correlación (100o/o de los sueros), entre los métodos la que es congruente con las bondades ya descritas para el método en múltiples trabajos científicos (3, 16, 12). Este estudio no permite un análisis exhaustivo de la sensibilidad del procedimiento, ya que las muestras positivas (51 sueros) correspondían a pacientes ya conocidos como portadores del HB_sAg. Se incluyó 212 sueros de pacientes negativos por otros procedimientos, los cuales fueron también negativos por reofóresis. Según el conjunto de sueros estudiados y basados en su clasificación previa como negativos o positivos, la técnica muestra ser altamente específica. En nuestro medio debe conscientizarse al personal profesional de laboratorio y Bancos de Sangre a fin de que valoren en su magnitud el peligro que conlleva transfundir a un paciente sangre a la cual no se le ha determinado HB_sAg. Los reactivos para reofóresis son factibles de preparar en nuestro medio a bajo costo y la determinación es de escasa complejidad. Tenemos en nuestras manos métodos inmunológicos de diferente sensibilidad para prevenir la hepatitis B post-transfusión, permaneciendo latente el problema de la hepatitis causados por

virus no A no B.

RESUMEN

Reoforesis: técnica de difusión en gel, utilizada para la detección de algunos marcadores relacionados con la Hepatitis B. Este trabajo consiste en una técnica modificada, que se lleva a cabo en discos de agar, a los cuales se les hace un modelo exagonal, que favorece la migración del suero desde la periferia hacia el Ac localizado en el centro, esta isla de agar es rodeada por un foso en el que se coloca el tampón, estos discos de agar son cubiertos con una tapa de plástico que posee un agujero en la parte central en dirección al Ac, esta configuración facilita por medio de la evaporación un flujo centrípeto de la solución tampón y el arrastre desde la periferia del suero de los huecos. Este protocolo se hizo en base a un total de 263 sueros tanto de pacientes positivos como de negativos y a la vez comparados por la técnica de E.L.I.S.A., logrando determinar que la reoforesis es satisfactoria sensibilidad y confiabilidad, además que esta técnica es fácil de llevarse a cabo en Bancos de Sangre por su simplicidad y bajo costo.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Abbott Laboratories. Radioinmunossay for the Detection to Hepatitis B. Surface. Antigen Diagnostics División; North Chicag IL 60064; 93-5702-R8-75 Rev Dic. 1978.
- 2.- Abbott Laboratories. Hepatitis Asociated Antibody (Anti-Australia Antigen) 125I (Human) Ausriar 11-125.
- 3.- Arech R. D., and others. Detection of Australia Antigen by radioinmunossay Proc. Natl acad Sci U.S.A. 68: 1056-1060, 1971.
- 4.- Almeida J.D. Hepatitis Bantigen an incomplete history. *The American Journal of the Medical Sciences* 270 (1): 104-114, 1975.
- 5.- Ashcavaí Mary, B.S. Manual for Hepatitis B Antigen Testing S.B. Saunders Company, Philadelphia, 1973, Cap 5: 85-98, Cap. 6: 99-112.
- 6.- Balcells, A. La Clínica y el laboratorio. II Edición, Editorial Marín, S.A., Barcelona, 1978.
- 7.- Blumberg, B.S. Australia Antigen as a Hepatitis virus. *The American Journal of Medicine*, 48 (1), 1970.
- 8.- Blumberg, B.S. Additional Specificities of Australia Antigen and the Possible Identification of Hepatitis carriers. *Nature*, 221: 915-196, January 1969.
- 9.- Eisen, H.N. Inmunología. Editores Salvat, Barcelona, 1979.
- 10.- Goldfield M. Black H.C., Bill J, Srifongse S., Pizzuit W. The Consequence of administering blood pretested for HB_sAg by third generation techniques a progress report *Am S Med Sci.* 42; 20-335, 1975.
- 11.- Lovine E. y otros. El Laboratorio en la Clínica. Editorial Médica Panamericana Junín 831, Buenos Aires 1975. (344-348).
- 12.- Mc Collum W. R. and Zuckerman J. A. Viral Hepatitis: Report on a WHO Informal consultation. *Journal of Medical Virology.* 8(1): 1-25, 1981.
- 13.- Richard, D. AACH, M.D. *Annals of Internal Medicine.* Vol 92 (4): 539-546, 1980.
- 14.- Rhodes A. J. At Van Rooyen C. E. Textbook of virology. V Edición. Williams & Wilkins Company U.S.A.
- 15.- Rose, R.N., Friendman H. Manual of Clinical Immunology. American Society for Microbiology. Washington DC, 1976, p. 482.
- 16.- Williams A, Chase W. Methods in immunology and inmonochemistry. *Academic Press Inc.* New York, 1971, p. 142-159 Vol III.