

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

EL ANALISIS RADIOINMUNOLOGICO DEL ANTIGENO DE LA HEPATITIS B *

BERNARDO SEPÚLVEDA, † § NELLY RATTONI, ¶
MIGUEL STOOPEN § y LUIS LANDA † §

Con el propósito de investigar la sensibilidad del análisis radioinmunológico (ARI) para detectar el antígeno de la hepatitis B (AgHB), en comparación con la técnica de contrainmunolectroforesis (CIEF), se estudiaron los sueros de 34 enfermos con cirrosis "alcohólica" y 25 con hepatitis crónica activa, así como los sueros de 149 personas aparentemente sanas y de 522 donadores "profesionales" de sangre. Se utilizó el equipo Ausria® de Abbott y los resultados demostraron la mayor sensibilidad del ARI para la identificación del AgHB, tanto en los pacientes con hepatopatías como en los portadores asintomáticos. En efecto, el ARI resultó positivo en 12 (35.2 por ciento) de los pacientes con cirrosis "alcohólica" y en 14 (56.0 por ciento) de los enfermos con hepatitis crónica activa,

* Trabajo presentado en la sesión ordinaria de la Academia Nacional de Medicina, celebrada el 4 de abril de 1973.

† Académico numerario.

¶ Banco de Sueros, Hospital General, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social.

§ Servicio de Gastroenterología, Hospital General, Centro Médico Nacional, Instituto Mexicano del Seguro Social.

mientras que la CIEF fue positiva en 5 (14.6 por ciento) y en 9 (36.0 por ciento), respectivamente. En las personas aparentemente sanas, el ARI fue positivo en dos (1.3 por ciento) y la CIEF en una (0.66 por ciento). En los donadores profesionales de sangre el ARI dio resultados positivos en 3 (0.57 por ciento), mientras que la CIEF fue negativa en todos. Este último resultado se debe a la eliminación sistemática de los portadores de AgHB por medio de la CIEF en el Banco Central de Sangre. De acuerdo con los resultados obtenidos, se considera que el ARI es un método más eficaz que las técnicas actualmente en uso, para el diagnóstico etiológico de un importante grupo de hepatopatías y para la prevención de la hepatitis posttransfusional.

La detección del antígeno de la hepatitis B (AgHB, anteriormente llamado antígeno Australia o antígeno asociado a la hepatitis), ha ido adquiriendo importancia creciente, tanto en el diagnóstico de los padecimientos hepáticos como en la prevención de la hepatitis postransfusional. Por ello no ha cesado la búsqueda de métodos más sensibles para descubrirlo, y es así como se han agregado recientemente las técnicas radioinmunológicas a los procedimientos antes utilizados. Estas técnicas tienen la ventaja de combinar la sensibilidad y la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo, con la posibilidad de medir cantidades mínimas de las sustancias, gracias a los radiofármacos con que están marcados los reactivos.

Las técnicas más generalmente usadas para identificar el AgHB han sido la inmunodifusión en gel de agar,¹ la contra-inmunolectroforesis,^{2,3} la fijación del complemento⁴ y la inhibición de la hemaglutinación.⁵ La primera es la menos sensible y las dos últimas son las de mayor sensibilidad en este grupo de pruebas. Por lo que se refiere a la contra-inmunolectroforesis, la rapidez y facilidad

en su ejecución, aunadas a su aceptable sensibilidad, la han convertido en uno de los métodos más empleados en la actualidad para la identificación del antígeno.

En cuanto al análisis o ensayo radioinmunológico, se ha venido utilizando desde hace unos 15 años, y cada vez con mayor amplitud, para la determinación de hormonas, drogas y diversas sustancias que se hallan en cantidades muy pequeñas en la sangre y otros líquidos orgánicos.⁶

En 1970 se describió la primera técnica radioinmunológica para la detección del AgHB y del anticuerpo correspondiente.⁷ La técnica tiene sensibilidad considerablemente superior a la de fijación del complemento; pero, además de complicada, exige cuatro días para la lectura de los resultados. En 1971 se dio a conocer otro método, llamado de doble anticuerpo,^{8,9} el cual tiene sensibilidad todavía mayor; pero, aun siendo de ejecución más simple, resulta complicado para uso general. Finalmente, el año pasado apareció un método, cuya sensibilidad parece semejante a la de este último, con las ventajas de ser sencillo, preciso y relativamente rápido y económico. El método se ha lla-

mado ensayo radioinmunológico directo o en fase sólida.^{10, 11}

El presente trabajo, que es en cierto modo continuación del que fue leído en el seno de la Academia en octubre de 1971, tiene por objeto dar a conocer nuestra experiencia en la identificación del antígeno de la hepatitis B con este método, particularmente en pacientes con padecimientos crónicos del hígado y en personas sin evidencia de enfermedad hepática, incluyendo donadores profesionales de sangre.

Material y métodos

Hemos usado el equipo con el nombre comercial de Ausria®, de los Laboratorios Abbott.* De manera esquemática, el método consiste en lo siguiente: se utilizan anticuerpos específicos de cobayo: unos, marcados con ¹²⁵I, y otros, sin marcar. La muestra de suero por estudiar se deposita en tubos de ensayo especiales, cubiertos con una capa de anticuerpos sin marcar. En caso de que el suero contenga antígeno, éste es fijado por el anticuerpo. Posteriormente se agregan al tubo los anticuerpos marcados; como el antígeno tiene múltiples sitios antigénicos, el anticuerpo marcado se fija a su vez en el antígeno. En consecuencia, se forma un complejo anticuerpo-antígeno-anticuerpo marcado, quedando el antígeno en cierta forma emparedado entre el anticuerpo sin marcar y el anticuerpo marcado con el radiofármaco. La radiactividad fijada en el tubo es proporcional a la cantidad de antígeno, y su medición en contador de rayos gamma permite determinar con

exactitud la presencia y la concentración del propio antígeno. El tiempo requerido para la lectura de la prueba es de 18 horas aproximadamente.

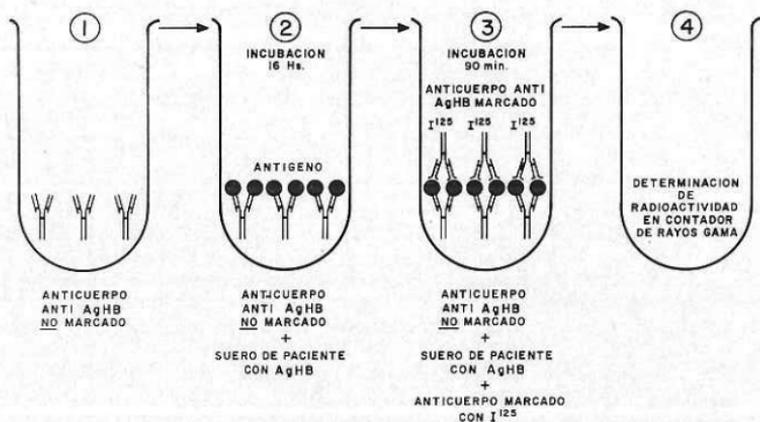
Un principio esencial del método es que los anticuerpos se adhieren firmemente, por un fenómeno de adsorción, a superficies poliméricas, tales como las de ciertos plásticos.¹² Por consiguiente, se emplean tubos de polipropileno, que el fabricante del equipo usado proporciona cubiertos ya con la capa de anticuerpo no marcado, tal como antes se dijo. Esta operación, simplifica la técnica y tiene la ventaja adicional de que la lectura de la radiactividad se hace en el mismo tubo de plástico.

En la figura 1 se presentan, también en forma esquemática, los pasos sucesivos del método, el cual se describe con más detalle a continuación: Se deposita una décima de mililitro del suero por estudiar, en el fondo del tubo de polipropileno cubierto con anticuerpo de cobayo sin marcar. Se cubre el tubo y se deja a la temperatura ambiente por 16 horas. El contenido del tubo se aspira y se lava el tubo cinco veces con dos mililitros de 0.01 M Tris (amortiguador, pH 7.1), cada vez. Se agrega a continuación en el fondo del tubo, 0.1 ml. de solución de anticuerpo HB, marcado con ¹²⁵I (0.1 µCi). Se cubre nuevamente el tubo y se deja 90 minutos a la temperatura ambiente. Se aspira el contenido y se lava otra vez el tubo cinco veces, con el mismo amortiguador. En seguida se registra la radiactividad en un contador de rayos gamma.*

Se estudiaron 730 muestras de suero, procedentes de tres grupos de sujetos adultos de ambos sexos. El primer grupo

* Ausria-125, Abbott Laboratories, Radio-Pharmaceutical Products Division, North Chicago, Illinois.

* Nuclear Chicago Corporation. Des Plaines, Illinois.



1. Método del análisis radioinmunológico para la identificación del AgHB. Presentación esquemática.

comprendió 59 enfermos con hepatopatías crónicas; el segundo, 149 personas aparentemente sanas, familiares de pacientes con absceso hepático amibiano; y el tercero, incluyó 522 donadores "profesionales" de sangre, también sin evidencia de padecimiento alguno. Los donadores provinieron del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, en donde se ha excluido para este objeto, desde octubre de 1971, a todo individuo en cuyo suero se identifique el AgHB por medio de contrainmunolectroforesis.

En el primer grupo quedaron incluidos 34 enfermos con cirrosis "alcohólica" y 25 con hepatitis crónica activa o agresiva.¹³ El diagnóstico se confirmó por biopsia de hígado en todos los casos de hepatitis crónica activa. En la mayoría de los casos de cirrosis, se confirmó también por autopsia o por biopsia; ésta no se llevó a cabo sólo en aquellos pacientes en que estuvo contraindicada por trastornos de la coagulación sanguínea.

En cada uno de los sueros examinados se hizo simultáneamente la investigación del AgHB por contrainmunolectroforesis. Además, con el propósito de estudiar por otro procedimiento la sensibilidad relativa de los dos métodos, se hicieron diluciones progresivas de seis sueros en que se había demostrado la presencia del AgHB, y se anotó la dilución máxima que dio lectura positiva en cada una de las muestras estudiadas.

Resultados

De los 34 enfermos con cirrosis "alcohólica", el antígeno de la hepatitis B se detectó por análisis radioinmunológico en 12 de ellos, y en 5 por contrainmunolectroforesis.* Estas cifras corresponden a 35.2 y 14.6 por ciento del total, respectivamente.

* Veintitrés de estos pacientes habían recibido una o más transfusiones de sangre en el periodo aproximado de un año anterior al presente estudio; en seis de ellos, que figuran, como es obvio, entre los 12 arriba citados, el ARI dio resultados positivos.

De los 25 pacientes con hepatitis crónica activa, se identificó el mencionado antígeno en 14 (56 por ciento) y en 9 (36 por ciento) de los mismos, por los métodos radioinmunológico y electrofórico, respectivamente.

En el grupo de 149 personas aparentemente sanas, parientes de enfermos con absceso hepático amibiano, la contrainmunolectroforesis dio reacción positiva en un caso y el análisis radioinmunológico en dos casos, que corresponden, respectivamente, a 0.66 y 1.3 por ciento del total.

En el grupo de 522 donadores de sangre todos los sueros dieron reacciones negativas con la contrainmunolectroforesis. Con la prueba radioinmunológica, se obtuvo reacción positiva en tres de los sueros, o sea, en 0.57 por ciento.

Estos resultados se presentan en el cuadro 1.

En cuanto a la investigación de la sensibilidad relativa de los dos métodos en-

Cuadro 1 Resultados de la detección del antígeno de la hepatitis B (AgHB) por contrainmunolectroforesis (CIEF) y análisis radioinmunológico (ARI)

Grupo	No. de estudios	Reacciones positivas			
		CIEF		ARI	
		No.	%	No.	%
Hepatopatías crónicas					
Cirrosis "alcohólica"	34	5	14.6	12	35.2
Hepatitis crónica activa	25	9	36.0	14	56.0
Personas aparentemente sanas	149	1	0.66	2	1.3
Donadores "profesionales" del Banco Central del C.M.N., I.M.S.S.	522	0*		3	0.57

* Estudio hecho en dos laboratorios diferentes.

ANTÍGENO DE HEPATITIS B

Cuadro 2 Sensibilidad relativa de la CIEF y del ARI en la detección del AgHB

Suero	Dilución máxima con resultados positivos	
	CIEF	ARI
1	1 : 32	1 : 2048
2	1 : 128	1 : 512
3	1 : 128	1 : 4096
4	1 : 4	1 : 1024
5	1 : 128	1 : 1024
6	1 : 32	1 : 512

sayados, el análisis radioinmunológico detectó el AgHB a diluciones 4 a 250 veces mayores que la otra técnica, tal como se muestra en el cuadro 2. Sin embargo, aunque este método demostró constantemente mayor sensibilidad, hubo grandes variaciones en la lectura de los títulos individuales. Esta falta de correlación refleja probablemente la heterogeneidad del antígeno, a la cual se hará mención más adelante.

Conviene agregar que el análisis radioinmunológico dió siempre resultados positivos en las muestras en que el antígeno se había identificado por el otro método. La situación inversa, es decir, que la prueba radioinmunológica fuera negativa y la otra positiva, no se registró en caso alguno.

Discusión

En el presente estudio se ha confirmado la mayor sensibilidad del análisis radioinmunológico en fase sólida, para la detección del antígeno de la hepatitis B, en comparación con la técnica de contrainmunolectroforesis.^{14, 15} Se ha confirmado así mismo, que esta mayor sensibilidad se pone de manifiesto tanto en el caso de

pacientes con padecimientos crónicos del hígado, como en el de los portadores asintomáticos. Se comprobó igualmente que todas las muestras que dieron resultados positivos con la contraelectroforesis dieron también resultados positivos con el análisis radioinmunológico. Por último, se corroboró que éste es un método simple, reproducible y relativamente rápido y económico.

Aparte de la utilidad del análisis radioinmunológico directo en el descubrimiento de mayor número de casos con antígeno circulante, recientemente se ha empleado con otro fin: la identificación más precisa de los determinantes antigénicos reconocidos en la actualidad.¹⁶ De acuerdo con estos distintos determinantes, se acepta por ahora que existen cuando menos dos subtipos del antígeno, llamados ad y ay, los cuales son mutuamente excluyentes. El nuevo método ha demostrado también para este objeto, sensibilidad muy superior a la de la inmunodifusión en gel de agar, anteriormente usada.¹⁷

La única limitación del método, conocida hasta la fecha, es la posibilidad de obtener reacciones falsamente positivas en personas que tengan contacto frecuente con cobayos y que hayan desarrollado anticuerpos contra las globulinas del animal. La falsa reacción se vuelve negativa al incubar el suero humano problema con suero de cobayo, que inhibe los mencionados anticuerpos.¹⁸

Es indudable, por tanto, que el análisis radioinmunológico representa un avance importante en el estudio del antígeno de la hepatitis B. Para referirnos sólo a su aplicación práctica, salta a la vista la superioridad del método para el diagnóstico de los padecimientos del hígado, y más aún para la detección de portadores

asintomáticos del antígeno. La mayor utilidad de tal detección es, obviamente, excluir a estos sujetos como donadores de sangre, con el propósito de seguir abatiendo la cifra de hepatitis postransfusionales.

Sin discutir por el momento otros aspectos interesantes del presente estudio, por ejemplo, la interpretación de la elevada frecuencia con que se halló AgHB en los enfermos con cirrosis alcohólica, hallazgo que en sí mismo amerita investigación especial, es procedente formular aquí dos preguntas:

La primera es ¿cuáles han sido los resultados de la eliminación de los donadores con antigenemia B de los bancos de sangre, utilizando las técnicas comunes, y en particular la contraelectroforesis?

En la comunicación que presentamos hace 18 meses a la Academia sobre el tema,¹⁹ insistíamos en la necesidad de introducir estas técnicas en los bancos de sangre y calculábamos que el riesgo de la hepatitis postransfusional podría reducirse en un 50 por ciento con la aplicación de las mismas. Es probable que este cálculo haya sido optimista y que la proporción esté más bien cerca de 25 por ciento, de acuerdo con investigadores norteamericanos.²⁰ No obstante, vale la pena llamar la atención sobre los resultados que obtuvimos en el estudio de los donadores "profesionales" de sangre.

Como antes se dijo, estas personas han sido sometidas a selección, eliminando por medio de la aplicación sistemática de la contraelectroforesis a todos los individuos que tuvieron AgHB circulante. En el grupo que se incluye en el trabajo, cada uno de los sueros se examinó por duplicado y simultáneamente con la

mencionada técnica, en el propio Banco de Sangre y en el laboratorio del servicio de gastroenterología del hospital.

Ello explica que los resultados hayan sido negativos con la repetida técnica de contrainmunolectroforesis en este grupo, y explica también que se haya obtenido baja proporción de reacciones positivas con la prueba radioinmunológica, a diferencia de lo encontrado por otros autores en grupos no seleccionados.^{10, 14, 15} Así mismo, esta política de selección del Banco Central de Sangre ha significado, según nuestra experiencia, una reducción en la frecuencia de la hepatitis postransfusional semejante a la ya citada.

La segunda pregunta es: ¿el uso sistemático del análisis radioinmunológico para el mismo fin, conseguirá la desaparición de la hepatitis postransfusional? Sobre la base de la información actual, la respuesta es negativa. En efecto, se ha demostrado la transmisión de hepatitis con sangre en la cual no se había detectado el AgHB por medio del análisis radioinmunológico.^{10, 21} En algunos de estos casos, se tuvo la explicación del hecho al comprobar que la hepatitis del receptor, si bien inoculada con la sangre transfundida, fue del tipo A, o sea la variedad de corta incubación. Sin embargo, en los sujetos restantes, la hepatitis fue del tipo B, por lo cual es preciso admitir que en cierto número de casos, el antígeno escapa a la detección, aun con métodos tan sensibles como el análisis radioinmunológico.

Tres explicaciones pueden formularse al respecto: Que el antígeno se encuentre en cantidades tan pequeñas que sea imposible descubrirlo con las técnicas más sensibles de que se dispone en la actualidad; o que los anticuerpos utilizados en

la reacción no tengan la especificidad necesaria para detectar los distintos determinantes del antígeno; o bien, que un exceso de anticuerpo, unido al antígeno en la sangre del propio donador, oblitere los sitios antigénicos e interfiera de este modo con la reacción inmunológica *in vitro*.^{10, 22} Es probable que cada una de estas explicaciones juegue un papel en el fenómeno.

De cualquier manera, puede afirmarse que el análisis radioinmunológico permite identificar el AgHB en mayor número de pacientes y de portadores asintomáticos, que las técnicas actualmente en uso. Como consecuencia, representa un medio más eficaz, tanto para el diagnóstico etiológico de una importante grupo de hepatopatías, como para la prevención de la hepatitis postransfusional. Por añadidura, puede anticiparse que se introducirán mejoras en la técnica, con lo cual aumentará seguramente la utilidad del método en la práctica.

Los autores agradecen la colaboración del doctor Jorge Gallegos en el estudio de los pacientes, y la asistencia técnica de la Q.F.B. Martha Aubanel en las pruebas de laboratorio, así como la asesoría de los doctores Alfredo Cuarón, Felipe Gordon y Héctor Rodríguez Moyado.

REFERENCIAS

1. Prince, A. M.: *Relation of Australia and SH antigens*. Lancet 2:462, 1968.
2. Gocke, D. J., y Howe, C.: *Rapid detection of Australia antigen by counter immunoelectrophoresis*. J. Immunol. 104:1031, 1970.
3. Sepúlveda, B.; Landa, L.; Cervantes, L. F., y Larrauri, J. A.: *El antígeno asociado a la hepatitis (Australia) en las enfermedades crónicas del hígado*. Rev. Gastroent. Méx. 37: 217, 1972.
4. Shulman, R. N., y Barker, L. F.: *Virus-like antigen, antibody and antigen-antibody complexes measured by complement fixation*. Science 165:304, 1969.
5. Vyas, G. N., y Shulman, R. N.: *Hemagglutination assay for antigen and antibody as-*

- sociated with viral hepatitis. *Science* 170:332, 1970.
6. Berson, S. A., y Yalow, R. S.: *Radioimmunoassay: a status report*. En: *Immunobiology*. Good, R. A. y Fisher, D. W. (Eds.). Stanford, Sinauer Associates, Inc. 1971, p. 287.
 7. Walsh, J. H.; Yalow, R. S., y Berson, S. A.: *Detection of Australia antigen and antibody by means of radioimmunoassay techniques*. *Vox Sang.* 19:217, 1970.
 8. Aach, R. D.; Grisham, J. W., y Parker, C. W.: *Detection of Australia antigen by radioimmunoassay*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 68:1056, 1971.
 9. Hollinger, F. B.; Vorndam, V., y Dreesman, G. R.: *Assay of Australia antigen and antibody employing double antibody and solid-phase-radioimmunoassay techniques and comparison with the passive hemagglutination methods*. *J. Immunol.* 107:1099, 1971.
 10. Ling, C. M., y Overby, L. R.: *Prevalence of hepatitis B virus antigen as revealed by direct radioimmunoassay with ¹²⁵I antibody*. *J. Immunol.* 109:834, 1972.
 11. Ginsberg, A. L.; Conrad, M. E.; Bancroft, W. H.; Ling, C. M., y Overby, L. R.: *Prevention of endemic HAA-positive hepatitis with gamma globulin. Use of a simple radioimmune assay to detect HAA*. *New Engl. J. Med.* 286:562, 1972.
 12. Catt, K., y Treager, G. W.: *Solid-phase radioimmunoassay in antibody coated tubes*. *Science* 158:1570, 1967.
 13. De Groot, J.; Desmet, V. J.; Gedick, P.; Korb, G.; Popper, H.; Poulsen, H.; Scheuer, P. J.; Schmid, M.; Thaler, H., y Uehlinger, E.: *A classification of chronic hepatitis*. *Lancet* 2:626, 1968.
 14. Lewis, J. H., y Coram, J. E.: *Australia antigen detection. Comparison of results obtained with five CEP and one RIA test systems*. *Transfusion* 12:301, 1972.
 15. Hacker, E. J., y Aach, R.: *Detection of hepatitis-associated antigen and anti-HAA. Comparison of radioimmunoassay and counterimmunoelectrophoresis*. *JAMA* 223:414, 1973.
 16. Le Bouvier, G. H.: *The heterogeneity of Australia antigen*. *J. Infect. Dis.* 123:671, 1971.
 17. Ginsberg, A. L.; Bancroft, W. H., y Conrad, M. E.: *Simplified and sensitive detection of subtypes of Australia antigen (HB_{Ag}) using a solid-phase radioimmune assay*. *J. Lab. Clin. Med.* 80:291, 1972.
 18. Sgouris, J. T.: *Limitations of the radioimmunoassay for hepatitis B antigen* (C. al Ed.). *New Engl. J. Med.* 288:160, 1973.
 19. Sepúlveda, B.; Landa, L.; Aubanel, M., y Rodríguez-Moyado, H.: *Investigación del antígeno asociado a la hepatitis (Australia) en donadores "profesionales" de sangre*. *GAC. MÉD. MÉX.* 102:615, 1971.
 20. Alter, H. J.; Holland, P. V.; Purcell, R. H.; Lander, J. J.; Feinstone, S. M.; Morrow, A. G., y Schmidt, P. J.: *Posttransfusion hepatitis after exclusion of commercial anti-hepatitis-B antigen positive donors*. *Ann. Int. Med.* 77:691, 1972.
 21. Koretz, R. L.; Sheinbaum, A. J.; Fricke, H. L.; Holper, J. C., y Gitnick, G. L.: *Are highly sensitive screening methods for detecting hepatitis B antigen useful in preventing post-transfusion hepatitis?* (Res.) *Gastroenterology* 64:171, 1973.
 22. Shorey, J., y Combes, B.: *Selective heat inactivation of hepatitis B antibody (HB_{Ab}) in sera containing both hepatitis B antigen (HB_{Ag}) and HB_{Ab}* (Res.) *Gastroenterology* 64:172, 1973.