

REAÇÕES IMUNOLÓGICAS PARA A DETECÇÃO DO ANTÍGENO DE SUPERFÍCIE DA HEPATITE B (HBsAg)

Regina Tomie KIMURA **
Clara Fumico TACHIBANA **
Vera Lúcia CURY **
Augusta Kiyomi TAKEDA **

RIALA6/460

KIMURA, R. T.; TACHIBANA, C. F.; CURY, V. L. & TAKEDA, A. K. —
Reações imunológicas para a detecção do antígeno de superfície da hepatite B
(HBsAg). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(2):83-86, 1978.

RESUMO: 399 soros suspeitos de hepatite virótica e 105 soros antígeno HBs positivos provenientes de banco de sangue de São Paulo, SP, foram utilizados para comparar as técnicas de imunoeletroforese cruzada (IEC) e radioimunoensaio (RIE) com hemaglutinação passiva reversa (HAPR). A concordância entre RIE e HAPR foi de 81% e, entre a HAPR e IEC, foi de 58%. As hemácias preparadas em nossos laboratórios para o teste de HAPR não apresentaram diferenças significativas quando comparadas com as hemácias padrão e, guardadas até 6 meses a 4°C, não apresentaram alterações em sua sensibilidade. A reação de HAPR foi preferida pela sua sensibilidade e facilidade de execução.

DESCRITORES: hepatite, vírus B; antígeno de superfície.

INTRODUÇÃO

Várias técnicas têm sido aplicadas na detecção do antígeno HB_s, tais como imunodifusão (ID)^{1, 2, 31}, imunoeletroforese cruzada (IEC)^{4, 9}, fixação de complemento (FC)^{12, 13}, hemaglutinação passiva reversa (HAPR)^{6, 14} e radioimunoensaio (RIE)^{7, 8, 15}.

No entanto, reações como a ID, IEC e a FC são passíveis de crítica por serem de baixa sensibilidade, sendo esta última frequentemente anticomplementar. Já o RIE, apesar de ser considerado como o mais sensível, torna-se pouco prático em nosso meio, devido ao seu alto custo, como também pela necessidade de equipamentos especiais.

Por outro lado, a reação de HAPR possui alta sensibilidade, facilidade de execução, bem como custo mais baixo em relação ao RIE⁸. Essa reação baseia-se na utilização de hemácias sensibilizadas com anticorpos anti-HBs, e já vem sendo amplamente utili-

zada na triagem de soros de doadores nos maiores centros do Japão.

O presente trabalho tem como finalidade a obtenção de hemácias de carneiro sensibilizadas nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz e a comparação dessas com hemácias de outras procedências e, ao mesmo tempo, a comparação da reação de HAPR com RIE e IEC em soros de doadores e de portadores de hepatite infecciosa.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

399 soros de pacientes com suspeita de hepatite virótica, provenientes do Hospital Emílio Ribas, São Paulo, SP; 105 soros HBsAg positivos por RIE enviados por bancos de sangue de São Paulo, SP, dos quais o soro HB-13, selecionado como padrão, foi utilizado em diluições dobradas para comparação de sensibilidade entre diferentes técnicas.

* Realizado na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

** Do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Reações

Radioimunoensaio — Foi realizado utilizando-se os reagentes Ausria II-125, dos Laboratórios Abbott do Brasil.

Imunoelektroforese cruzada — Foi realizada pela técnica já descrita^{4,5}. As lâminas de vidro foram recobertas com uma camada de 1 mm de espessura de ágar Oxoid n.º 3, em tampão veronal (pH 8.6, 0,075 µ). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, 30 mA, durante 30 minutos.

Hemaglutinação passiva reversa — As amostras de soros a serem examinadas foram diluídas em série, na razão log₂, com tampão diluente (10 g de sacarose, 2 g de azida sódica, 5 ml de soro normal de coelho e 5 ml de soro normal de cavalo para 1.000 ml de tampão fosfato salino (P.B.S.), pH 7,2, em placas de microtitulação em 'V', com alças diluídas de 25 microlitros¹⁹. Em cada cavidade da placa foram adicionados 25 microlitros de hemácias sensibilizadas com gamaglobulina anti-HBs. As placas foram agitadas e deixadas em repouso durante 2

horas à temperatura ambiente. O título foi considerado como sendo a maior diluição do soro onde ainda ocorre a aglutinação de hemácias. As hemácias J. M. S., utilizadas como padrão, foram cedidas pela Jichi Medical School, Tochigi-Ken, Japão, enquanto que as hemácias 008 e 329 foram sensibilizadas nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz, com gamaglobulina anti-HBs purificada em coluna de cromatografia em Sepharose 4B, segundo a técnica de IMAI *et alii*⁵.

RESULTADOS E CONCLUSÃO

Pode-se observar na tabela 1 a variação de sensibilidade das diferentes técnicas empregadas, quando comparadas em relação a um mesmo soro antígeno HBs positivo.

A imunoelektroforese cruzada demonstrou menor sensibilidade com uma detecção de antígeno até a diluição de 2^º. Já a reação de hemaglutinação passiva reversa mostrou uma sensibilidade mais próxima à do radioimunoensaio, principalmente em relação à hemácia 008, com uma positividade até a diluição 2¹⁸.

TABELA 1

Detecção do HBsAg por diferentes técnicas

Diluição do soro padrão HB-13	RIE * cut-off 342 cpm	R-PHA ***				IEC ***
		Hemácias JMS	Hemácias IAL-329	Hemácias IAL-008	Auscell	
não diluído	+ 5605	+	+	+	+	+
2 ¹	+ 5606	+	+	+	+	+
2 ²	+ 6836	+	+	+	+	+
2 ³	+ 6528	+	+	+	+	+
2 ⁴	+ 7154	+	+	+	+	+
2 ⁵	+ 5994	+	+	+	+	+
2 ⁶	+ 6208	+	+	+	+	+
2 ⁷	+ 7153	+	+	+	+	neg.
2 ⁸	+ 6937	+	+	+	+	neg.
2 ⁹	+ 6901	+	+	+	+	neg.
2 ¹⁰	+ 6586	+	+	+	+	neg.
2 ¹¹	+ 5711	+	+	+	+	neg.
2 ¹²	+ 3995	+	+	+	+	neg.
2 ¹³	+ 1876	+	neg.	+	+	neg.
2 ¹⁴	+ 2861	+	neg.	+	neg.	neg.
2 ¹⁵	+ 828	neg.	neg.	+	neg.	neg.
2 ¹⁶	+ 560	neg.	neg.	+	neg.	neg.
2 ¹⁷	+ 474	neg.	neg.	+	neg.	neg.
2 ¹⁸	+ 428	neg.	neg.	+	neg.	neg.
2 ¹⁹	+ 361	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
2 ²⁰	+ 353	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

* RIE: Ausria II-125, pesquisa do HBsAg por radioimunoensaio.

** R-PHA: hemaglutinação passiva reversa

JMS: hemácias padrão da Jichi Medical School, Japão

IAL-329: hemácias preparadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

IAL-008: hemácias preparadas no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo

Auscell: hemácias liofilizadas dos Laboratórios Abbott do Brasil.

*** IEC: imunoelektroforese cruzada.

TABELA 2

Teste do X^2 para o estudo da variação da sensibilidade entre as hemácias J.M.S. e 329, utilizadas na reação de hemaglutinação passiva reversa

Reações	Amostra 1		Amostra 2		Total
	fo	fe	fo	fe	
RIE	153	153,3	60	59,6	213
HAPR *	122 (J.M.S.)	123,1 (J.M.S.)	49 (329)	48,0 (329)	171
IEC	72	70,6	26	27,4	98
Total	347	347	135	135	482

* Na amostra 1 foi utilizada a hemácia J. M. S. na reação HAPR, enquanto que na amostra 2 esta reação foi realizada com a hemácia 329.

fo — frequência observada.

fe — frequência esperada.

H₀ — as amostras provêm de um mesmo universo. Estatisticamente, não existe diferença significativa na sensibilidade das duas partidas de hemácias.

H₁ — as amostras não provêm de um mesmo universo. Há diferença significativa na sensibilidade das duas partidas de hemácias.

$$X^2_{\text{obs.}} = \frac{(fo-fe)^2}{fe} = 0,0006 + 0,0098 + 0,0278 + 0,0027 + 0,0253 + 0,0715 = 0,1377$$

$$X^2_{\text{tab.}} = X^2_{2, 0.05} = 5,991$$

Como $X^2_{\text{obs.}}$ é menor que $X^2_{\text{tab.}}$, aceita-se que, estatisticamente, não há diferença significativa na sensibilidade das duas partidas de hemácias, 329 e J. M. S., com um nível de significância de 0,05.

TABELA 3

Concordância entre as diferentes técnicas para detecção de HBsAg

RIE/HAPR	RIE/IEC	HAPR/IEC
213/171	213/98	171/98
80,3%	46,0%	57,3%

O teste comercial Auscell (Laboratórios Abbott) mostrou um resultado equivalente à reação de hemaglutinação passiva reversa com as hemácias J. M. S., porém inferior com as hemácias 008 produzidas em nosso laboratório.

Analisando-se os resultados obtidos pela imunoeletroforese cruzada e pelo radioimunoensaio, com os obtidos pela hemaglutinação passiva reversa, com duas partidas de hemácias diferentes, J. M. S. e 329, pode-se admitir estatisticamente que existe uma homogeneidade de sensibilidade entre as duas partidas (ao nível de significância de 0,05) como se pode observar na tabela 2. Assim sendo, para a comparação da reação de

hemaglutinação passiva reversa com as técnicas do radioimunoensaio e imunoeletroforese cruzada foram somados os valores obtidos com os dois lotes.

Observando-se a tabela 3, nota-se que, de 213 casos HBs positivos por RIE, 171 foram positivos por HAPR e 98, positivos por IEC.

Relacionando-se as três técnicas, obtém-se uma concordância de 80,3% entre RIE/HAPR, 46,0% para RIE/IEC e 57,3% para HAPR/IEC.

A reação de HAPR possui uma sensibilidade bastante próxima à do RIE, enquanto a IEC é bem menos sensível, mesmo quando comparada à HAPR, o que está de acordo com os dados obtidos por PETERSON *et alii*¹⁰.

A reação de HAPR, devido à sua relativa sensibilidade, facilidade no preparo dos reagentes, baixo custo e rapidez na sua realização, torna-se bastante prática para ser utilizada, tanto em diagnóstico como em triagem de doadores.

Agradecimentos

À Sra. Abigail de Carvalho Pereira pela análise estatística do presente trabalho.

RIALA6/460

KIMURA, R. T.; TACHIBANA, C. F.; CURY, V. L. & TAKEDA, A. K. — Immunological tests for the detection of the hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38(2):83-86, 1978.

SUMMARY: Commonly employed laboratory tests for detection of the hepatitis B surface antigen show low sensitivity or are cumbersome to carry out. With the reverse passive haemagglutination (RPHA) technic, there is no such problems, and the test is very sensitive and easy to carry out. The results of three tests, counter-immunoelectrophoresis, radioimmunoassay (RIA) and RPHA were compared. The sera were from patients suspected of viral hepatitis as well as from blood donors. The purification of HBsAg to obtain the anti-sera and the sensitization of red cells were done in this laboratory. These red cells have not shown any significant difference with the red cell control and there was no alteration of their sensitivity after 6 months at 4°C. The agreement between RIA and RPHA was 81%. With this procedure, public health laboratories can prepare a reagent at low price for a simple sensitive test which may be extremely useful for evidenciation of HBsAg in patients and in blood-bank donors.

DESCRIPTORS: hepatitis virus B; surface antigen.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLUMBERG, B. S. — Polymorphisms of the serum proteins and the development of iso-precipitins in transfused patients. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 40: 377-86, 1964.
2. BLUMBERG, B. S. — A "new" antigen in leukemia sera. *J. amer. med. Ass.*, 191: 541-6, 1965.
3. GERMAIN, K. H.; STURDIVANT, S. K. & RIGHTSSEL, W. A. — Evaluation of a red cell agglutination test for detection of Australia antigen (HBsAg). *Appl. Microbiol.*, 25: 524-7, 1973.
4. GOCKE, D. J. & HOWE, C. — Rapid detection of Australia antigen by counterimmunoelectrophoresis. *J. Immunol.*, 104:1031-2, 1970.
5. IMAI, M.; YAMASHITA, Y.; MIYAKAWA, Y. & MAYUMI, M. — Haemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australia antigen. *Immunology*, 27: 871-8, 1974.
6. JUJI, T. & YOKOCHI, T. — Hemagglutination technique with erythrocyte coated with specific antibody for detection of Australia antigen. *Jap. J. exp. Med.*, 39: 615-20, 1969.
7. LANDER, J. J.; ALTER, H. J. & PURCELL, R. H. — Frequency of antibody to hepatitis-associated antigen as measured by a new radioimmunoassay technique. *J. immunol.*, 106: 1166-71, 1971.
8. MILLER, J. P. & MORDECAI, B. G. — Evolution of a solid-phase radioimmunoassay technique for the detection of hepatitis associated antigen. *J. nucl. Med.*, 13: 454, 1972.
9. PESENDORFER, F.; KRASNITZKY, O. & WEWALK, F. — Immunelektrophoretischer Nachweis von "Hepatitis-assoziiert-antigen" (Au/SH-antigen). *Klin. Wochenschr.*, 48: 58-59, 1970.
10. PETERSON, D. A.; FROESNER, G. G. & DEINHARDT, F. W. — Evaluation of passive hemagglutination, solid-phase radioimmunoassay, and immunoelectrophoresis for the detection of hepatitis B antigen. *Appl. Microbiol.*, 26: 376-80, 1973.
11. PRINCE, A. M. — An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 60: 814-21, 1968.
12. PURCELL, R. H.; HOLLAND, P. V.; WALSH, J. H.; WONG, D. C.; MORROW, A. G. & CHANOCK, R. M. — A complement-fixation test for measuring Australia antigen and antibody. *J. infect. Dis.*, 120: 383-6, 1969.
13. SHULMAN, N. R. & BARKER, L. F. — Virus-like antigen, antibody, and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation. *Science*, 165: 304-6, 1969.
14. VYAS, G. N. & SHULMAN, R. N. — Hemagglutination assay for antigen and antibody associated with viral hepatitis. *Science*, 170: 332-3, 1970.
15. WALSH, J. H.; YALOW, R. & BERSON, S. A. — Detection of Australia antigen and antibody by means of radioimmunoassay techniques. *J. infect. Dis.*, 121: 550-4, 1970.
16. WEGMANN, T. G. & SMITHIES, O. — A simple hemagglutination system requiring small amounts of red cells and antibodies. *Transfusion*, 6: 67-73, 1966.

Recebido para publicação em 29 de setembro de 1977.