

NUEVAS TECNICAS DE ELISA APLICADAS AL DIAGNOSTICO DEL TORCH

Isabel Massin Bocca

Laboratorios Géminis C.A.

Resumen del taller presentado durante el VI Congreso de Bioanálisis en Margarita

(aceptado para su publicación: 6 agosto 1993)

Como todos sabemos, los agentes infecciosos, en su mayoría virales, agrupados bajo las siglas anglosajonas de Torch (Toxoplasmosis, Others, Rubeola, Citomegalovirus, Herpes) son responsables de cuadros patológicos que pueden estar desde la inocuidad del portador silencioso hasta cuadros muy graves si se presentan durante la gestación o cuando el organismo tiene comprometido su sistema inmunológico (1). El diagnóstico de estas afecciones resulta cada día más importante y por ello las técnicas para detectarlos deben afinarse en el tiempo.

Usualmente estos agentes no se detectan de manera directa buscando las partículas infecciosas, antes bien se detectan los anticuerpos que el mismo organismo produce ante la presencia del agente.

Como se sabe, la sola presencia de anticuerpos en la muestra de un paciente no es indicativo de enfermedad, ya que muchos pueden haber tenido contacto con la partícula infecciosa sin que por ello se desarrolle ninguna patología. Lo que es indicativo de enfermedad es por un lado la presencia de IgM, que indica una infección reciente o por otro lado una gran cantidad de anticuerpos IgG, que significa que la infección es aguda, o una reactivación, y que por lo tanto los anticuerpos IgM ya han desaparecido. La capacidad de poder distinguir entre estas situaciones es lo que da a las diferentes metodologías una mayor capacidad diagnóstica.

Las técnicas tradicionales han tratado de resolver este problema haciendo diluciones de las muestras positivas hasta encontrar aquella donde desaparece la positividad, o lo que es lo mismo, hallar el título de la muestra. Sin embargo, las técnicas de titulación tienen algunas desventajas, se ha demostrado que pueden verse afectadas significativamente por errores de pipeteo y por muestras no homogéneas, inconvenientemente mezcladas (2). Es por ello que deben aceptarse para este tipo de técnicas un error entre 1 a 2 diluciones (3). Estas circunstancias hacen

de los métodos que utilizan las titulaciones métodos semicuantitativos, puesto que el resultado es una aproximación a la cantidad de anticuerpos presentes.

Las titulaciones se utilizan corrientemente en las técnicas que detectan anticuerpos totales, como la hemaglutinación y la fijación de complemento, que si bien son útiles, sencillas y económicas, no tienen la capacidad de diferenciar tipo de anticuerpo ni tienen la sensibilidad de otras técnicas como la inmunofluorescencia y el ELISA. Estas diferencian tipos de anticuerpos, tienen una mayor sensibilidad, pero resultan más costosas y el pretender hacer títulos o curvas de referencia por la más sensible de todas ellas, el ELISA, era hasta 1992 un procedimiento poco factible en la rutina.

En 1992 se desarrolló en Alemania, un procedimiento que permite detectar el título de una muestra en una sola dilución, utilizando la metodología ELISA. La misma pertenece a la firma Behring Diagnostika, representada en Venezuela por Laboratorios Géminis y se denomina método alfa, por ahora se aplica a la cuantificación de los títulos o concentraciones de los anticuerpos IgG.

El método se basa en la estandarización por parte del fabricante de cada lote de reactivo mediante la utilización de dos constantes ∂ y β . A partir de la revisión de los resultados de cada lote frente a curvas de calibración realizadas con cambios de variables controlados, los valores de ∂ y β son calculados por un procedimiento matemático, un método iterativo basado en la estrategia de mutación-selección (Meyer y Doptaka, en preparación, citado en 4).

El título se obtiene a partir de la fórmula:

$$\log_{10} \text{ título} = \partial \cdot OD^{\beta} \quad (*)$$

Donde ∂ y β son las constantes dadas por el fabricante para cada lote, y que se incluyen dentro de cada kit, y OD es la densidad óptica de cada muestra,

de manera que a a partir de la lectura de un solo pozo, se obtiene el título del paciente, sin necesidad de diluir.

Ese mismo año, Dopatka y Giesendorf, compararon los resultados de muestras obtenidos a partir del método alfa con aquellos logrados por ELISA utilizando diluciones y curvas de referencia. Los resultados no solo fueron equivalentes, sino que además los del método alfa mostraron un coeficiente de variación menor. Los autores concluyen que los resultados por este método son equivalentes a la titulación con ELISA en exactitud y superiores en precisión, economizando tiempo y dinero (4).

Otras ventajas del método alfa sobre las titulaciones, es que el comportamiento de los resultados es continuo y no discreto, como puede observarse en la Fig. 1 (tomada del folleto promocional "Single Point Quantification de Behringwerke, Marburg, Alemania), lo que ubica el resultado del paciente en un valor puntual y no en un intervalo de valores. Esto permite detectar diferencias pequeñas en los valores del paciente, que no son apreciables por titulación, como se ilustra en la Fig. 2 (tomada del folleto promocional "Single Point Quantification de Behringwerke, Marburg, Alemania).

El método tienen un control interno por paciente para descartar la presencia de la mayoría de los falsos positivos. Como se sabe, los virus no tienen la capacidad de reproducirse por si solos, y para su cultivo deben utilizarse células a partir de las cuales se multiplica. Si eventualmente el paciente ha desarrollado inmunidad contra la célula utilizada en el cultivo tendremos un positivo que no se debe al virus, la cual es la principal causa de los resultados falsos

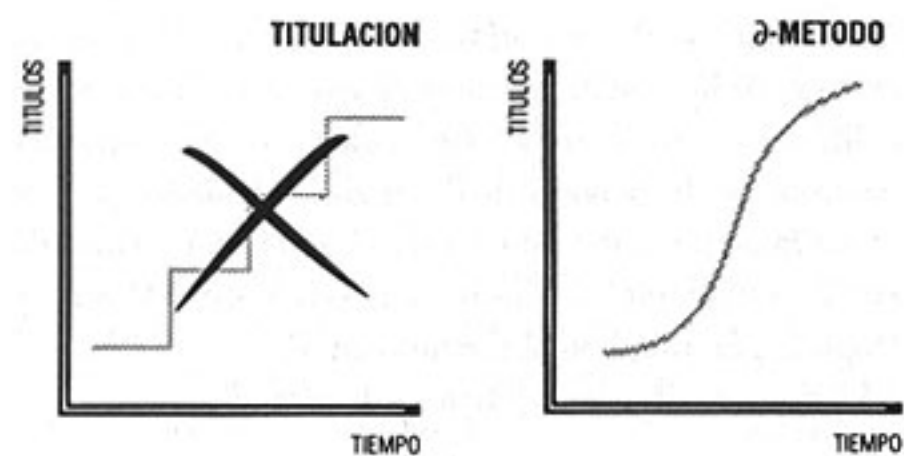
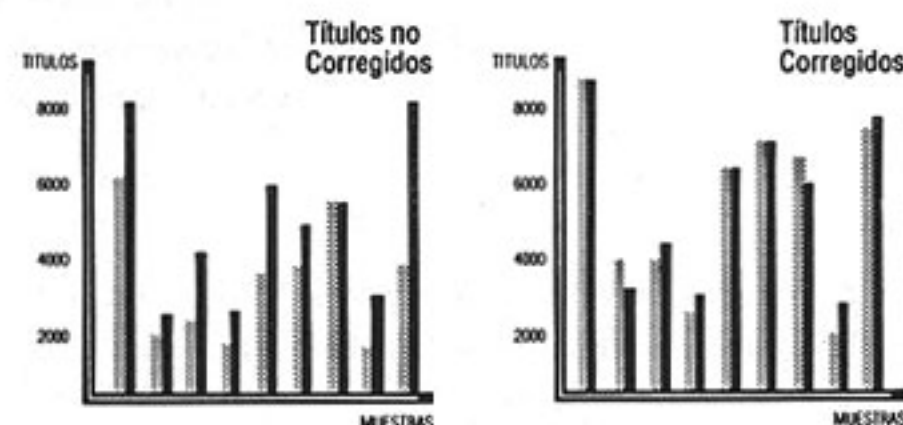


FIGURA 1 NUEVAS TECNICAS DE ELISA APLICADAS AL DIAGNOSTICO DEL TORCH

positivos en los ELISA aplicados a la detección viral. Esta metodología utiliza un pozo recubierto con las proteínas virales para atrapar los anticuerpos contra el

virus y un pozo de control recubierto con las proteínas celulares. La absorbancia de la muestra es la diferencia entre estas lecturas.

FIGURA 2



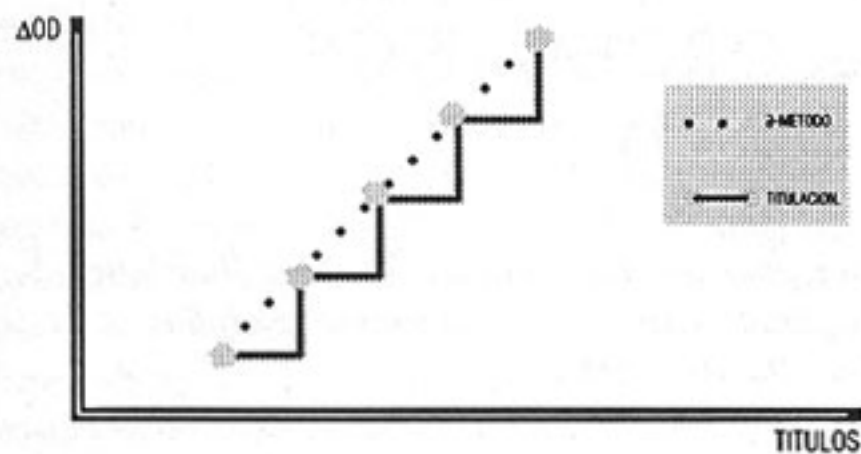
Otra estrategia de control la constituye la presencia del control positivo en el kit, lo cual tiene múltiples propósitos. En primer lugar es el control positivo del ensayo en sí en el sentido usual de todo ELISA. En segundo lugar, lleva el control de calidad, puesto que sus absorbancias deben colocarse entre un intervalo dado por el fabricante (como si se tratara de un control comercial). Por último, la absorbancia del control obtenida en el ensayo se compara con la absorbancia nominal obtenida por el fabricante, para lograr un factor de corrección para las muestras (*).

Este factor de corrección es muy importante, porque permite disminuir las diferencias que por efecto de factores externos como las temperaturas, operarios, instrumentos, entre otros, puedan presentarse en las densidades ópticas, tanto intra laboratorios como inter laboratorios, haciendo que los resultados de diferentes instituciones puedan ser comparables, como se ilustra en la Fig. 3 (tomada del folleto promocional "Single Point Quantification de Behringwerke, Marburg, Alemania).

Las técnicas son homogéneas entre las distintas pruebas, tanto en el número como en la duración de las incubaciones, de manera que pueden realizarse simultáneamente, por ejemplo: Toxo IgG e IgM, CMV IgG e IgM y Rubéola IgG e IgM, juntas como si fuera una sola prueba. Para ello los reactivos son universales: un solo buffer de lavado, un solo sustrato, un mismo conjugado para las IgG y otro para las IgM, un mismo buffer de dilución para las IgG y otro para las IgM, haciendo la diferencia los antígenos ligados a la placa.

El poder llegar a determinar el título o las concentraciones en UI/ml de una muestra desconocida empleando tan solo un micropozo de ELISA y un

FIGURA 3



control, es toda una innovación en el diagnóstico del TORCH. El poder detectar certeramente la cantidad de IgG, junto con la presencia o ausencia de IgM, utilizando la metodología más sensible de la que disponemos para el TORCH, da una mayor visión diagnóstica en este campo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Krugman S.; Katzman S.; Gershon A.; Wilfert C. 1985. *Enfermedades Infecciosas*. 8ª Edición. Editorial Interamericana Mc Graw Hill. México D.F.
2. Husson-van Vliet I.; Roussel P. 1988. "Pipeting Errors in viral titration: A useful approach". *J Virol. Methods* 22: 183-190.
3. De Savigny D.; Voller A. 1980. "The communication of ELISA data from laboratory to clinician". *J. Immunoassay* 1:105-128.
4. Dopatka H.D.; Giesendorf B. 1992. "Single Point Quantification of Antibody by ELISA without Need of a Reference Curve". *J Clin Lab Analysis* 6: 147-492.

(*) El fabricante puede proveer de una calculadora especial para facilitar el cálculo.