

Kits para uso en bancos de sangre

Por Javier Urioste, Ximena Simón, Paula Tucci y Juan Andrés Abin-Carriquiry*

El equipo de investigación y desarrollo de la empresa nacional Laboratorios Celsius S.A ha desarrollado un kit de ELISA de tercera generación para su utilización en el tamizaje de anticuerpos para los virus oncogénicos HTLV-I y HTLV-II en los Bancos de Sangre.

Los virus oncogénicos son aquellos que en su proceso de infección pueden provocar la transformación de una célula normal en una célula cancerosa. Estos virus son responsables de un porcentaje considerable de tipos de cáncer entre los que se incluyen algunos linfomas (cánceres del sistema linfático, sistema encargado de combatir las infecciones, formado por las amígdalas, el bazo, la médula ósea y la cadena de ganglios linfáticos) y el Sarcoma de Kaposi (un cáncer que provoca el crecimiento de zonas de tejido anormal bajo la piel, que puede extenderse al endotelio de vías digestivas y respiratorias).

En 1980, fue descubierto el primer virus humano oncogénico, denominado HTLV-I (del inglés, *Human T-Lymphotropic Virus Type 1*) identificado en los linfocitos de un paciente con linfoma cutáneo de células T. Hasta la fecha entre 15 y 20 millones de personas alrededor del mundo se encuentran afectadas por este virus, siendo endémico en algunas regiones de América del Sur, África Central, el Caribe y Japón.

El virus HTLV-I es el principal agente causal de dos enfermedades importantes: La primera es una enfermedad crónica, la Paraparesia espástica tropical, también conocida como HAM (Mielopatía Asociada a HTLV-1). Esta enfermedad se caracteriza por una pérdida progresiva de la mielina, una susancia aislante que rodea las conexiones entre neuronas, que deriva en una progresiva debilidad muscular de los miembros inferiores, entre otros síntomas. La otra enfermedad causada por el virus es la denominada "Linfoma asociado a células T en adultos" (ATLL, del inglés *Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma*), un cáncer linfático de mal pronóstico.

El virus HTLV-II (del inglés, *Human T-Lymphotropic Virus Type 2*) por su parte, fue descubierto poco después del descubrimiento de HTLV-I. Se ha demostrado que están muy relacionados a nivel proteico y genómico, presentando aproximadamente un 70% de similitud a



nivel aminoacídico entre ambos.

A diferencia de HTLV-I, este virus no ha sido asociado directamente a ninguna enfermedad, aunque se ha asociado con algunos casos de HAM y otros síntomas de enfermedades neurológicas. Este virus es endémico en algunas poblaciones nativas de América del Sur y África Central, alcanzando porcentajes en algunos casos de hasta un 50%.

Para ambos virus, la ruta más importante de contagio es la vía de transmisión sexual, la transmisión vertical (de madre hijo, con una probabilidad de contagio del 25%, que aumenta con los sucesivos amamantamientos), y mediante sangre contaminada (ya sea por transfusiones sanguíneas o el uso de drogas intravenosas).

Tamizaje y diagnóstico

Actualmente en varios países, y en particular en el Mercosur, es obligatorio en los bancos de sangre el tamizaje o pesquisa de anticuerpos contra los virus HTLV-I y II. El diagnóstico inicial se realiza por la técnica de ELISA (del inglés: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que detecta los anticuerpos presentes en muestras de suero o plasma de la sangre de los donadores

de sangre; los sueros que son repetidamente positivos son confirmados por la técnica "western blot".

Para aplicar la técnica de ELISA en primer lugar se dejan adsorber las partículas del antígeno correspondientes a proteínas específicas de ambos virus en el fondo de una microplaca con pequeños pozos o pocillos. -Los antígenos son las sustancias que dentro del cuerpo humano desencadenan la formación de anticuerpos y pueden causar una respuesta inmunitaria-. Para ello se disuelven en una solución de sensibilización y se los deja interactuar, durante un determinado tiempo, con la superficie de la microplaca donde quedarán adheridos e inmovilizados.

Sobre la placa se vierte la muestra. Si la muestra posee anticuerpos específicos contra alguno de los antígenos, éstos se unirán a la placa formando un complejo proteico estable, o sea un grupo de dos o más proteínas unidas mediante enlaces no-covalentes (interacciones proteína-proteína).

Luego, la presencia de los anticuerpos a los virus mencionados capaces de reconocer a los antígenos, se detecta mediante el agregado de un anticuerpo específico unido a una enzima (en este caso la peroxidasa) que reconoce los anticuerpos del donador de sangre que se encuentran formando el complejo proteico.

Finalmente se agrega un sustrato incoloro de la enzima, una sustancia que reacciona con la enzima que, si está presente por la unión al complejo antígeno-anticuerpo, lo transforma en un producto coloreado, siendo proporcional la cantidad de color generada, medible con un espectrofotómetro especial para microplacas, a la concentración de anticuerpos presente en la muestra.

Si el valor obtenido supera el valor límite establecido para la técnica, dicha muestra es catalogada como positiva. En cambio si el valor cuantificado es menor, la muestra es catalogada como negativa.

Tercera generación

En los primeros ensayos de ELISA utilizados para el tamizaje de HTLV, se trabajaba con antígenos virales purificados (ensayos de primera generación). En la siguiente generación, los antígenos virales utilizados fueron enriquecidos con antígenos recombinantes (producidas en el laboratorio mediante ingeniería genética en células distintas a las que se producen originalmente) pertenecientes a las proteínas inmunogénicas más relevantes de los virus. Hoy en día, la gran mayoría de las técnicas de ELISA empleadas para este fin utilizan únicamente antígenos recombinantes o antígenos sintéticos (obtenidos en el laboratorio) y son denominados ensayos de tercera generación.

Estos ensayos tienen la ventaja de que no solo evitan los riesgos de trabajar con los virus para la extracción de los antígenos (como es el caso de los ensayos de primera y segunda generación), sino que también aumentan considerablemente la especificidad del ensayo. Dichas técnicas alcanzan una sensibilidad y una especificidad que ronda en el entorno del 100% y el 98%, respectivamente.



Desarrollo nacional

Debido a la escasez de proveedores de estos productos a nivel mundial y al alto costo que estos tienen para los sistemas de salud, Laboratorios Celsius S.A se propuso desarrollar, validar y producir a nivel industrial un kit de ELISA de tercera generación para su utilización en el tamizaje de anticuerpos para los virus HTLV-I y HTLV-II en los Bancos de Sangre. A partir de una revisión bibliográfica, se diseñaron tres construcciones génicas (tres plásmidos conteniendo la secuencia de un antígeno cada uno) correspondientes a proteínas altamente antigénicas pertenecientes a ambos virus. Los tres antígenos fueron producidos mediante tecnologías de ADN recombinante en *Escherichia Coli* y posteriormente purificados por cromatografía. Los mismos fueron inmovilizados en placas de ELISA y evaluados frente a paneles comerciales de muestras positivas y negativas, que fueron oportunamente catalogadas por métodos de referencia.

Una vez optimizado el ensayo, se formularon todos los componentes del kit (placa sensibilizada, diluyente de muestras, solución de conjugado enzimático, sustrato, solución de lavado, solución de frenado y controles positivo y negativo) de forma tal de que los mismos sean estables por al menos un año a 4°C.

El kit fue validado por la Unidad de Control de Calidad del Servicio Nacional de Laboratorio de Salud Pública, del Ministerio de Salud Pública, mediante paneles comerciales e internos obteniendo valores de sensibilidad y especificidad del 100%. A partir de su validación el producto fue registrado ante el Ministerio de Salud Pública. Actualmente el reactivo se está comercializando en varios Bancos de Sangre a nivel nacional donde se llevan analizados ya más de 2.000 volúmenes de sangre, con descartes inferiores al 0.1%, al tiempo que se encuentra en fase de registro en diversos países de Latinoamérica.

**Javier Urioste (MSc.), Ximena Simón (Lic.), Paula Tucci (MSc.) y Juan Andrés Abin (Dr.QF) son integrantes del equipo de I+D Laboratorios Celsius SA, División Diagnostica.*