

EQUIPO COMPUTARIZADO PARA EL CONTROL Y ANALISIS DE INMUNOSUEROS APLICANDO DIFUSION DE LA LUZ.

P.Foresto, R.J.Rasia*, B.Riquelme, J.Valverde,

Facultad de Ciencias Biológicas y Farmacéuticas Universidad Nacional de Rosario e Instituto de Física Rosario, Suipacha 53, 2000 Rosario.

En un trabajo previo(★) se presentó el desarrollo de una técnica basada en el fenómeno de "light scattering" a 90°, para analizar la cinética de agregación de inmunocomplejos (Ag-Ac). Con el objetivo de aplicar dicha técnica al control de calidad de soluciones de inmunoglobulinas utilizadas en análisis inmunológicos, mediante la determinación de la concentración de sustancia activa presente en las mismas, se perfeccionó el montaje experimental primitivo, incorporándole un convertidor A/D con 32 memorias de 256 "bites" cada una, conectado a una PC de 640 K. De esa forma se eliminó, prácticamente, toda subjetividad en el procesamiento y se incrementó la precisión y repetitividad de los resultados. Se implementó un programa para la transferencia y almacenamiento numérico. Los resultados de una determinación surgen por impresora 20 minutos después de iniciado el proceso experimental. Tal brevedad en el tiempo de procesamiento, reviste especial importancia en las determinaciones inmuno-bioquímicas relacionadas con Bancos de Sangre y Neonatología.

(★) Rasia, R.; Valverde, J.; Foresto, P.; Riquelme, B.; *Desarrollo de un método óptico para la determinación de concentraciones antigénicas desconocidas.* Reunión Nacional de Física N°73 (AFA '88).

INTRODUCCION

La cuantificación del contenido antigénico (Ag) de una suspensión, requiere de una técnica que no dependa del tamaño absoluto de los complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). En este trabajo se han investigado los procedimientos que aplican el fenómeno de difusión de la luz por partículas pequeñas, para determinar concentraciones desconocidas en una muestra dada, a través de la cinética de formación de complejos transitorios cuyos tamaños van creciendo en el curso de la reacción.

Se establecen los valores máximos de la variación, en el tiempo, de la intensidad medida a 90° con respecto al haz incidente (I_{90}), tomándose como valores de referencia los correspondientes a antiglobulina (algG) estándar humana en concentraciones conocidas. Bajo condiciones de Rayleigh-Debye, la variación en el tiempo de la intensidad medida depende solamente del cambio de tamaño y forma de los dispersores y sería independiente del tamaño molecular absoluto del complejo Ag-Ac formado en la primera etapa de la reacción de las inmunoprecipitinas⁽¹⁾. Se ha demostrado⁽²⁾, que las técnicas basadas en las medidas de la variación en el tiempo de la intensidad

de luz difusa, resultan ser más confiables, para la determinación de concentraciones séricas de algG, que las técnicas de inmunodifusión radial en gel (IDR), la que depende de las migraciones difusionales del estándar y de la muestra en una matriz gel. En el caso particular de las algG de uso inmunoematológico, las técnicas clásicas de control están condicionadas a otros parámetros que pueden modificar los resultados, tales como la densidad antigénica de los eritrocitos con distintos fenotipos Rh, que conducen a modificaciones en la capacidad de reacción. El método propuesto permite el control de calidad de algG, independizándolo del parámetro mencionado.

CONSIDERACIONES TEORICAS

Las reacciones Ag-Ac, y la subsiguiente formación de las inmunoprecipitinas ocurre en tres etapas:

ETAPA I

Anticuerpo (Ac) + Antígeno (Ag) → Ac Ag (instantánea)
 $x \text{ Ac} + y \text{ Ag} \longrightarrow \text{Ac}_x \text{ Ag}_y$

ETAPA II (formación de complejos transitorios)

$m \text{ Ac}_x \text{ Ag}_y \longrightarrow (\text{Ac}_x \text{ Ag}_y)_m$ (segundos o minutos)

ETAPA III (formación de precipitados)

$(\text{Ac}_x \text{ Ag}_y)_m \longrightarrow \text{PRECIPITADO}$ (minutos u horas)

Estas reacciones, han sido ampliamente estudiadas^(3,4), verificandose que, de las tres etapas, la

* Investigador CONICET

segunda es la que recibe la mayor contribución del estudio del fenómeno de difusión de luz durante los estados intermedios de la reacción. Esto es debido a que la primera etapa es demasiado rápida como para ser observada, y en la última la intensidad varía muy poco en el tiempo, necesiéndose largos períodos de tiempo (incluso horas) para obtener datos apreciables.

La formación de complejos transitorios $(Ac_x Ag_y)_m$ a medida que transcurre el tiempo, lleva a un incremento del tamaño de los centros dispersores, por lo cual se producen variaciones en la intensidad dispersada. Se dice que una partícula es un dispersor de Rayleigh cuando sus dimensiones (d), son muy pequeñas comparadas con la longitud de onda (λ) de la luz incidente, es decir: $d \ll \lambda$. Para este caso, se ha demostrado ⁽⁵⁾ que la intensidad dispersada a un ángulo Θ está dada por:

$$I(\Theta) = I_0 \frac{8 \pi^4}{r^2 \lambda^4} \alpha^2 (1 + \cos^2 \Theta) \quad (1)$$

donde I_0 es la intensidad de la luz incidente, r es la distancia desde el dispersor al observador y α es la polarizabilidad del dispersor.

Si hay N partículas dispersantes por cm^3 y C es la concentración en g/cm^3 , la polarizabilidad de las N partículas dispersantes se puede expresar de la siguiente manera ⁽⁶⁾:

$$\alpha = \frac{n_0}{2\pi} \frac{dn}{dc} \frac{M}{N_A} \quad (2)$$

donde n_0 es el índice de refracción del medio (solvente), M es el peso molecular promedio, dn/dc es el cambio en el índice de refracción debido a la formación de partículas dispersantes y N_A es el número de Avogadro.

Si las partículas son ahora de tamaño comparable a la longitud de onda (d es del orden de λ), cada partícula puede ser subdividida en elementos de volumen donde cada uno de ellos es tratado como un dispersor de Rayleigh, excitado por el campo incidente, el cual no es perturbado por la presencia del resto de las partículas. Estamos, entonces, en presencia de la llamada dispersión de Rayleigh-Debye, para la cual la intensidad de luz dispersada resulta ser ⁽⁵⁾:

$$I'(\Theta) = P(\Theta) I(\Theta) \quad (3)$$

donde $P(\Theta)$ es un factor de tamaño y forma, e $I(\Theta)$ es la intensidad dispersada a un ángulo Θ por dispersores de Rayleigh.

En sus trabajos, Buffone ⁽⁴⁾ estimó que el diámetro medio de los complejos $Ag-Ac(d)$, es de 450 a 700 nm

aproximadamente. Por esto, para una longitud de onda de luz incidente del orden de los 600 nm, resulta que d es del orden de λ y suponiendo que el índice de refracción de las partículas es similar al del medio que las rodea, la dispersión se produce en condiciones de Rayleigh-Debye ($d \approx \lambda$).

Diferenciando la ecuación(3) con respecto al tiempo, obtenemos:

$$V(\Theta) = \frac{d I'(\Theta)}{dt} = \frac{d I(\Theta)}{dt} P(\Theta) + \frac{d P(\Theta)}{dt} I(\Theta) \quad (4)$$

Si la solución es muy diluida, es factible suponer que α variará muy poco en el tiempo, por lo cual:

$$d \alpha^2 / dt \approx 0$$

en consecuencia, de la ec. (1):

$$d I(Q) / dt \approx 0$$

de donde se concluye que:

$$V(\Theta) = \frac{d I'(\Theta)}{dt} \approx I(\Theta) \frac{d P(\Theta)}{dt} \quad (5)$$

Es decir que, en las condiciones de Rayleigh-Debye, la variación en el tiempo de la intensidad de luz dispersada en la dirección Θ , a la que denominamos velocidad de la dispersión $V(\Theta)$, dependerá solamente de la manera en que vayan cambiando en el tiempo el tamaño y la forma de los dispersores, y sería independiente de la forma molecular inicial de los complejos dispersores $Ac_x Ag_y$, es decir, de aquellos formados en la primera etapa de la reacción de las inmunoprecipitinas.

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizó una solución isotónica de inmunoglobulina G humana al 16.5%, producida por la Universidad Nacional de Córdoba (Laboratorio de Hemoderivados), (Lote 8201 - 234) y purificada por precipitación con sulfato de amonio, diálisis y cromatografía en DEAE (Celulosa).

Se analizaron sueros de distintos laboratorios y lotes. Como suero estándar se utilizó el lote AHS 224-1 GD.

Se utilizó un laser de He-Ne (modelo LO121P de Laser Optics S.A.-Argentina) de 3mW de potencia. La longitud de onda del haz es de 632.8nm, y tiene un factor de polarización 500:1. El laser fue montado de

manera tal que el haz atravesara horizontalmente la celda y que el campo E de la radiación electromagnética fuera perpendicular al plano de dispersión elegido para las mediciones (plano perpendicular a la superficie del líquido).

Los otros elementos se listan a continuación:

- Celda contenedora de la muestra: fue construida en vidrio Pirex con fondo negro mate. Diámetro externo = 2.58 cm., diámetro interno = 2.23 cm., altura = 1.50cm.
- Agitador magnético: se adaptó al estativo de un microscopio óptico en el lugar del condensador.
- Fotodetector: se usó un fotomultiplicador RCA 6342A, alimentado por una fuente estabilizada regulable entre 500 V y 1000 V.
- Convertidor de señal: A/D con 32 memorias de 256 bites cada una.
- Ordenador: PC de 640 K MicroSistemas MS71T.
- Osciloscopio doble haz Tektronix 502A.
- Microamperímetro digital.

En la fig. 1 se reproduce un esquema del montaje, mostrando los distintos componentes y sus conexiones.

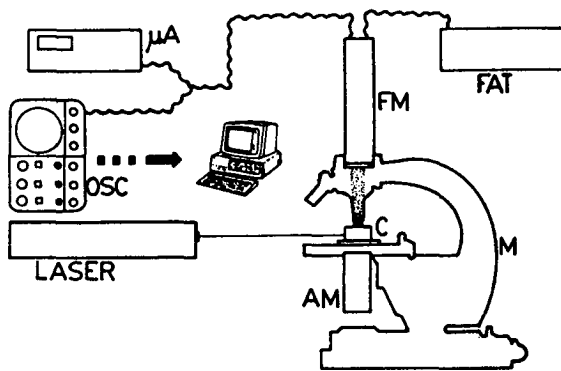


Fig. 1 Esquema del montaje utilizado

RESULTADOS Y DISCUSION

El valor máximo de la velocidad de dispersión ($V_{max} = (dI_{90}/dt)_{max}$) fue graficado en función de la concentración de algG, para soluciones estándares de concentraciones conocidas. Se obtiene así una curva de calibración mediante la cual se pueden determinar las concentraciones de antiglobulina de los sueros a controlar. En la fig. 2 se muestra la variación del valor máximo de la velocidad de dispersión (V_{max}) en función de la concentración de algG. Se observa que la proporcionalidad entre V_{max} y C es directa en el rango entre 16.3 mg/ml y 163 mg/ml, para las condi-

ciones de trabajo establecidas. Para valores inferiores a 163 mg/ml los valores de I_{90} en función del tiempo resultan ser del orden de los errores de medición, como consecuencia del ruido de fondo. Para concentraciones superiores 163 mg/ml se alcanza la saturación, es decir, el anticuerpo deja de estar en exceso.

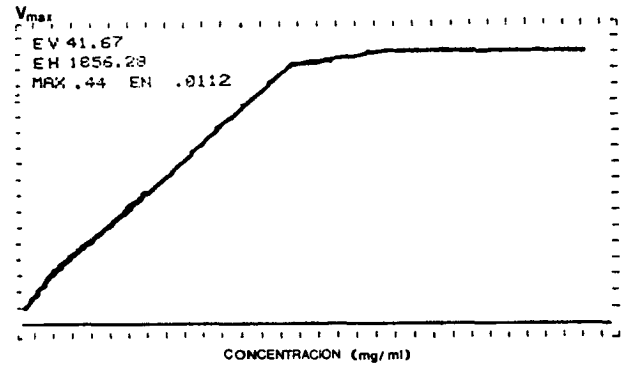


Fig. 2: Variación del valor máximo de la velocidad de dispersión en función de la concentración de alg G en mg/me.

Se estudiaron antisueros de distintos lotes y marcas comerciales observando diferencias significativas en sus actividades inmunológicas

En la fig.3 se muestran los registros computados de la I_{90} por los inmunocomplejos, IgG - algG, en función del tiempo desde el inicio de la reacción, en presencia de exceso de IgG, obtenidos para una misma concentración de sueros algG.

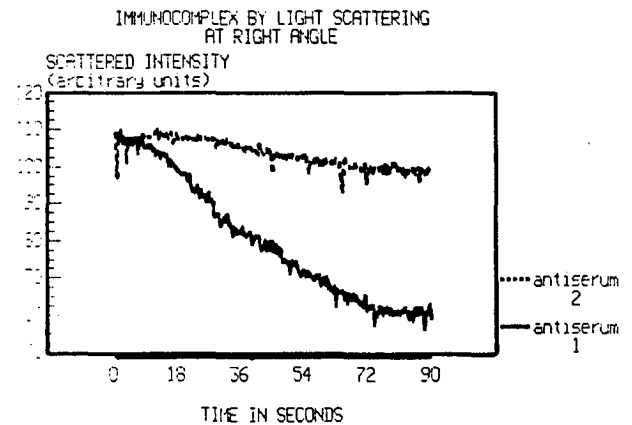


Fig. 3: Registros computados de la I_{90} en función del tiempo desde el comienzo de la reacción.

Las I_{90} se incrementan rápidamente a partir del momento en que se inicia la reacción, por el contacto del Ag con el Ac, indicando la formación de com-

plejos transitorios que comienzan a convertirse en dispersores Rayleigh - Debye a partir de los segundos iniciales. El valor máximo se alcanza entre 1 y 3 segundos, luego de lo cual se observa una lenta caída, probablemente debida a la aparición de partículas agregadas de gran tamaño (del orden de los dispersores de Mie), causantes de una interferencia destructiva en la intensidad dispersada (¹).

El valor V_{max} puede ser medido para cualquier reacción Ag-Ac en la cual los complejos primarios se agregan rápidamente para formar especies macromoleculares cuyo peso y tamaño se van incrementando a medida que transcurre el tiempo. Las curvas de calibración trazadas graficando los valores máximos de la velocidad de variación de dispersión a $90^\circ (V_{max})$ en función de la concentración antigénica, permiten cuantificar el contenido de Ag o Ac (en mg/ml) en muestras de concentraciones desconocidas.

Al aplicar este método a los sueros comunmente utilizados en los laboratorios inmunohematológicos, hemos encontrado, entre sueros de actividad supuestamente similar, marcadas diferencias, como las que se pueden notar al observar las curvas de la fig.3. El estudio de sueros provenientes de distintos laboratorios y lotes, ha permitido observar la diferencia entre la calidad de los mismos, por lo cual este método puede ser considerado útil y rápido como control de calidad de dichos sueros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la asistencia técnica y la colaboración del Arq. José María Carcedo en la confección de tablas y gráficos y en la compaginación del texto.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) G. Sittampalam, George S. Wilson, Analytical Chemistry, 1984; 56; 2170-2175
- (2) Narayaman, S., Clin. Chem., 1982; 28(7); 1528-1531.
- (3) Tengerdy, T.P. and Small, W.H., Nature, 1966; 210; 708-710
- (4) Buffone, G., Savory, J., Hermans, J., Clin.Chem. 1975; 21(2); 1735-1745
- (5) Kerker, M., *The Scattering of Light*, Academic Press - N.Y. 1959
- (6) Van Holde, K.E., *Physical Biochemistry* - Prentice-Hall, Englewood Cliffs (Ed), Cap.9, N.J.1971
- (7) Deaton, C. D., Maxwell, K. W., Smith, R. S., Clin.Chem., 1976; 22; 1465-1471
- (8) Virella, G., Fudemberg, H., Clin.Chem., 1977; 24; 808-814
- (9) Aura Meas, S.Temy and Gutesdon, J., Quantitative Enzime Immuno Assay, Blacnell, (Oxford)-7-23

CEILAP
CITEFA - CONICET
ZUFRIATEGUI Y VARELA
1603 - VILLA MARTÍN
REPUBLICA ARGENTINA