

**Pág. 1:** Evaluación de un kit ELISA para detección de Sífilis

**Pág. 2:** Agenda de Congresos

**Pág. 3:** Estandarización del Tiempo de Protrombina

**Año XXXVI - Setiembre 2002**

**Boletín del Servicio Bibliográfico de Wiener Laboratorios S.A.I.C.**  
<http://www.wiener-lab.com.ar>

Director: Gustavo A. Capriotti - Redactor: Cristina M. Crepaldo - Editor Responsable: Wiener Laboratorios S.A.I.C. - 2000 - Rosario - Argentina

## EVALUACION DE UN KIT ELISA PARA DETECCION DE SIFILIS

La utilización de la clásica reacción VDRL es la técnica más ampliamente difundida para la investigación de reagentes sífilíticos y, dada su practicidad y bajo costo, se constituye en el elemento principal para la detección de individuos infectivos para sífilis. Sin embargo la utilización de técnicas sensibles para la investigación de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* proporcionan mayor seguridad especialmente en determinados estadios evolutivos de la enfermedad. Los métodos para el análisis de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* están basados en ensayos de Aglutinación Pasiva o bien en los ELISA de mayor sensibilidad.

Gabriela Cecilia Jaffré - Silvina Molinari - Juan Angel Rossi  
Laboratorio Central Hospital Escuela "Eva Perón" (HEEP) - Sección Inmunohematología y Serología Banco de Sangre

### Objetivos

**E**valuar el comportamiento de un ensayo no competitivo para la detección de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* en la población mencionada, fundamentalmente sobre muestras procedentes de donantes de sangre. Analizar la performance de su metodología en la adaptación a sistemas analíticos automatizados.

### Materiales y métodos

**Reactivos:** kit Sífilis ELISA recombinante Wiener lab., descrito sintéticamente al igual que su base metodológica. Todas las muestras se testearon en forma automatizada con el instrumental BRIO y se compararon con otras técnicas

treponémicas de uso habitual en el Laboratorio (ELISA - Trepanostika TP - Organon Teknika, MHA-TP - Syphagen TPHA - Biokit, AP Serodia - TP PA - Fujirebio Inc. - Bayer).

**Población analizada:** donantes de sangre del Servicio de Medicina Transfusional del HEEP y otros Servicios derivantes y pacientes de Consultorio Externo e Internación del HEEP. Muestra positivas de seroteca.

### Características del sistema

**Tipo de ensayo:** inmunoenzimático - ELISA sandwich.

**Pocillos sensibilizados** con antígenos recombinantes del *Treponema pallidum*.

**Muestra:** suero o plasma (10 ul). Se procesa en una dilución 1/21 al igual que los correspondientes controles positivos y negativos.

**Conjugado:** anticuerpos anti-Inmunoglobulinas humanas/Peroxidasa.

**Sistema revelador:** peróxido de hidrógeno/tetrametilbencidina ( $H_2O_2$ /TMB).

**Stopper:** ácido sulfúrico 2 N.

**Temperatura de trabajo:** 37°C y temperatura ambiente.

**Tiempo total de reacción:** 1 hora 30 minutos.

### Sensibilidad, especificidad y valores predictivos

**N° de muestras analizadas:** 180 distribuidas de la siguiente manera:

Grupo A: 15 muestras de Seroteca VDRL Reactivas

Grupo B: 15 muestras de Pacientes

Grupo C: 150 muestras de Donantes de sangre

### Resultados obtenidos

Los resultados se muestran en los cuadros I y II.

**Sensibilidad (S):** razón entre los verdaderos positivos (vp) y la suma de los verdaderos positivos y falsos negativos (fn):

$$S = \frac{vp}{vp + fn}$$

$$S = \frac{20}{20 + 0} = 1$$

$$\text{Sensibilidad del ensayo} = 100\%$$

**Especificidad (E):** cociente entre el n° de verdaderos negativos (vn) y la suma de verdaderos negativos y falsos positivos (fp):

$$E = \frac{vn}{vn + fp}$$

$$E = \frac{159}{159 + 1} = 0,994$$

$$\text{Especificidad del ensayo} = 99,4\%$$

**Valor predictivo positivo (VPP):** razón entre los verdaderos positivos y la suma de verdaderos y falsos positivos:

$$VPP = \frac{vp}{vp + fp}$$

$$E = 20 / 20 + 1 = 0,952$$

$$\text{Valor predictivo positivo} = 95,2\%$$

**Valor predictivo negativo (VPN):** cociente entre verdaderos negativos y la adición de verdaderos y falsos negativos:

$$\text{VPN} = \text{vn} / \text{vn} + \text{fn}$$

$$\text{VPP} = 159 / 159 + 0 = 1$$

$$\text{Valor predictivo negativo} = 100\%$$

**Prevalencia (P):** cociente entre la suma de verdaderos positivos y falsos negativos y el total de muestra de la población analizada (n).

$$P = \text{vp} + \text{fn} / n$$

$$P = 20 + 0 / 180 = 0,111$$

$$\text{Prevalencia} = 11,1\%$$

Observación: la prevalencia obtenida

considera una población influenciada por 15 muestra positivas de seroteca; si solamente se analizan las 165 correspondientes a incógnitas el valor real es 3,03% derivado de:  $5 + 0 / 165 = 0,0303$

**Absorbancias obtenidas:** (la corrección se realizó contra blanco de aire y no blanco de reactivos).

Abs promedio CN: 0.078

Abs promedio CP: 1.775

Cut-off promedio: 0.328

Abs promedio m (P): 1.835

(La Abs de la muestra discordante fue 0.885 para el cut-off de la corrida = 0.344)

Abs promedio m (N): 0.089

## CUADRO I

	Wiener lab. ELISA		Organon ELISA		Biokit MHA-TP		Serodia AP	
	P	N	P	N	P	N	P	N
Grupo A	15	0	15	0	15	0	15	0
Grupo B	3	12	3	12	3	12	3	12
Grupo C	3	147	2	148	2	148	2	148

## CUADRO II

ELISA Wiener lab.	MUESTRAS		
	Infectadas	No Infectadas	Total
P	vp = 20	fp = 1	vp + fp = 21
N	fn = 0	vn = 159	fn + vn = 159
Total	vp + fn = 20	fp + vn = 160	180

P: positiva; N: negativa

## Conclusiones

El kit Sífilis ELISA recombinante Wiener lab. para la determinación de anticuerpos anti-*Treponema pallidum* demostró ser totalmente apto para su utilización como técnica de tamizaje en Serología de Banco de Sangre mostrando sensibilidad ideal y especificidad adecuada.

Presentó concordancia muy buena con la técnica tomada como referencia y fue óptima su adaptación al equipo proce-

sador de microplacas de ELISA. Mostró excelente reproducibilidad de Controles Negativos y Positivos.

## Bibliografía

- Margni, R. - Inmunología e Inmunológica - 5ª Edición, Editorial Panamericana, 1996.
- OPS - Manual de Procedimientos de control de calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre, 1994.



## Agenda de Congresos

- ✓ 65° Congreso Argentino de Bioquímica
- VII Congreso de Bioquímica y Patología Clínica del Mercosur
- XXVII Jornadas de la Enseñanza y del Ejercicio de la Bioquímica

Se llevará a cabo en el Círculo de Oficiales del Mar, Sarmiento 1864, Buenos Aires, del 15 al 18 de Octubre de 2002

Organiza  
Asociación Bioquímica Argentina

Participan  
· Sociedad Brasileira de Patología Clínica (SBPC)  
· Sociedad Uruguaya de Patología Clínica (SUPAC)

Comisión Científica  
Presidente Honorario:  
Dr. Ricardo Margni  
Coordinador: Dr. Néstor Litwin

Informes  
011-4381-2907 / 4384-7415

- ✓ MEDICA 2002
- 34<sup>th</sup> International Trade Fair with Congress World Forum for Medicine

Se llevará a cabo en el Düsseldorf Trade Fair Centre en la ciudad de Düsseldorf, Alemania, del 20 al 23 de Noviembre de 2002

Organizan  
· Deutsche Gesellschaft zur Förderung der medizinischen Diagnostik e.V.  
· Gesellschaft Deutscher Krankenhaustag mbH (GDK)

Informes  
[www.medica.de](http://www.medica.de)

Reedición:

# ESTANDARIZACION DEL TIEMPO DE PROTROMBINA

Los anticoagulantes orales derivados de la cumarina son ampliamente utilizados en la prevención de las trombosis recurrentes ya que por su actividad de antagonista de la vitamina K, favorecen la aparición en circulación de las proteínas no modificadas denominadas PIVKA (proteínas inducidas por antagonistas de la vitamina K).

A pesar de que aparentemente no tienen actividad importante como factores de coagulación, las PIVKA tienen la capacidad de afectar los tiempos de protrombina llevados a cabo con determinadas tromboplastinas, dependiendo de su origen. El tiempo de protrombina (TP) o tiempo de Quick en una etapa, sigue siendo aún hoy la prueba más comúnmente usada en el seguimiento de las terapias con anticoagulantes orales. Dado los estrechos márgenes entre los que debe estar comprendido el tiempo de Quick para que el tratamiento sea eficaz, debe considerarse especialmente la reproducibilidad y precisión en la expresión de los resultados. Estos tratamientos se extienden a veces por períodos de meses o años durante los cuales los pacientes pueden concurrir a distintos laboratorios. El empleo de tromboplastinas de diverso origen, hace que no puedan compararse los resultados cuando se expresan en segundos. Esto hace necesario hallar una forma de estandarización de los resultados que permita comparar los informes provenientes de distintos laboratorios con distintas tromboplastinas. En el pasado se consideraba que un paciente se encontraba dentro de un rango terapéutico correcto si su TP (empleando tromboplastina de cerebro humano) se encontraba entre 2 y 4 veces por encima del valor de un pool de plasmas frescos normales. Hoy se sabe que si bien esto es

cierto para algunas tromboplastinas, no lo es para otras, con las cuales una prolongación de semejante magnitud correspondería a una dosis de anticoagulante excesivamente alta, con el consecuente riesgo de complicaciones hemorrágicas.

### Sensibilidad de las tromboplastinas

Existen varios factores que pueden contribuir a los distintos grados de sensibilidad observados en las diferentes tromboplastinas. Entre ellos se encuentran la especie y el tejido de origen y la concentración relativa de otros componentes en la formulación del reactivo, tales como el calcio. Pero además, es importante la variación relacionada con la sensibilidad a las PIVKA, que puede ser a veces apreciable. En la Figura 1 se muestra el caso de dos hipotéticas tromboplastinas que a pesar de tener iguales tiempos normales de 12 segundos, difieren en la sensibilidad a los factores Vitamina K dependientes.

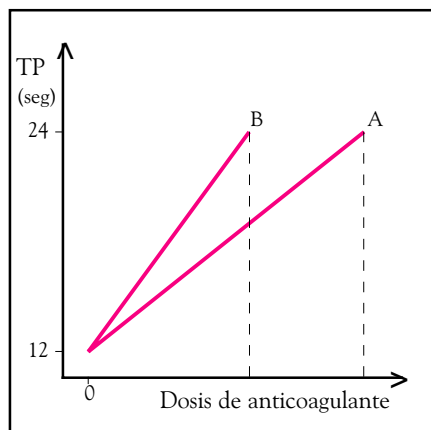


Fig. 1

Con el reactivo menos sensible (la curva A) el paciente debería recibir una dosis mayor de anticoagulantes para alcanzar la razón de 2.0 que se obtiene con reactivo más sensible. Si la razón

2.0 es apropiada para el reactivo más sensible, usando la misma razón para una tromboplastina menos sensible, se requerirá una dosis mayor, lo que reduce la cantidad de factores Vitamina K dependientes funcionales a un nivel peligrosamente bajo.

La sensibilidad de la tromboplastina debe ser tenida en cuenta para que el TP pueda ser utilizado efectivamente en un buen control terapéutico. El primer intento por encontrar un sistema de estandarización fue el que condujo a expresar los resultados como cociente de protrombina (r) que se define como el cociente entre el TP de la muestra incógnita/TP de un control (plasma control o pool de plasmas frescos).

$$r = \frac{\text{TP del paciente}}{\text{TP del control}}$$

Si bien este método elimina variables del tipo técnico que pueden afectar de la misma forma al control y a la muestra, no corrige las diferencias originadas por el uso de tromboplastinas de distinta naturaleza.

En 1977 el "Expert Committee on Biological Standardization" de la Organización Mundial de la Salud, preparó una tromboplastina humana liofilizada que se designó como patrón primario. Es la "International Reference Preparation 67/40". A partir de allí se prepararon patrones secundarios, calibrados contra la preparación de referencia. Estas tromboplastinas de distintos orígenes (conejo o bovino) permitieron calibrar a su vez los distintos reactivos comerciales. Empleando las tromboplastinas calibradas se ideó un nuevo sistema para obtener una escala común de expresión de TP. Se comprobó que si se graficaban los r de un conjunto de plasmas obtenidos con una tromboplastina de referencia, se obtiene una recta que pasa por el origen de coordenadas y cuya ecuación es la siguiente:

$$y-1 = b(x-1)$$

donde:

y = r en segundos para la tromboplastina comercial;

x = r en segundos para la tromboplastina de referencia;

b = constante

Es razonable pensar que si un "r" aumenta con una tromboplastina, aumentará también con la otra, de modo que la variable que queda es la pendiente "b" de la recta.

Cuando esta variable se determina con un patrón de referencia previamente calibrado con el de la Organización Mundial de la Salud, se denomina Constante Internacional de Calibración C.I.C. de la tromboplastina comercial y varía con cada lote. En estas condiciones el valor "x" de la ecuación es el llamado Cociente Calibrado Internacional (C.C.I.).

$$C.C.I. = 1 + \frac{(r-1)}{C.I.C._{lote}}$$

donde:

C.C.I. = Cociente Calibrado Internacional de la muestra de plasma en cuestión;  
C.I.C.<sub>lote</sub> = Constante Internacional de Calibración del lote de Tromboplastina en uso

$$r = \frac{TP \text{ plasma del paciente (seg)}}{TP \text{ pool plasmas normales (seg)}}$$

Este fue el primer paso importante para comparar resultados entre sí, obtenidos con distintas tromboplastinas. Sin embargo, este modelo no es válido en todos los casos y sus limitaciones hicieron que más recientemente, el International Committee for Standardization in Haematology y el International Committee on Thrombosis and Haemostasis emitieran una comunicación en la que se recomienda un nuevo sistema de estandarización del TP denominado INR (International Normalized Ratio).

El método, que guarda bastante semejanza con el anterior, emplea para la construcción de la gráfica de los tiempos de Quick, una escala logarítmica en lugar de la lineal, y los valores para la tromboplastina de referencia se encuentran en el eje de las ordenadas (Figura 2).

La pendiente de la recta así obtenida se denomina Índice de Sensibilidad Internacional (ISI).

Conociendo el valor ISI de la tromboplastina comercial que se utilice, los valores salen de la siguiente fórmula:

$$INR = r^{ISI}$$

donde r = TP del paciente/TP de un pool de plasmas normales

El valor de INR puede obtenerse con la fórmula anterior o con una tabla de conversión habitualmente suministrada con los kits comerciales.

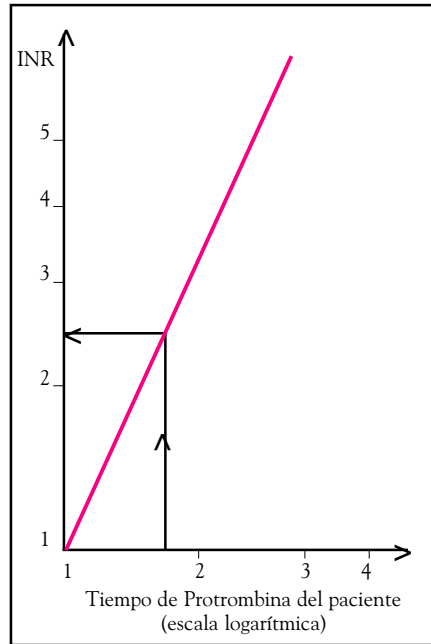


Fig. 2

### Ventajas del uso del sistema INR

La adaptación y uso del INR puede hacer posible una más segura y efectiva terapia para pacientes con riesgo de trombosis por varias razones.

Un sistema internacionalmente aceptado puede facilitar un mayor consenso universal acerca de los rangos terapéuticos óptimos que permitirán aprovechar al máximo la experiencia acumulada en el mundo acerca de los tratamientos de este tipo.

El informe de los resultados en términos de INR puede proveer valores terapéuticamente más confiables y significativos y mejorar la correlación de los resultados entre distintos laboratorios.

### Consideraciones para el uso apropiado del sistema INR

En primer lugar debe tenerse en cuenta que tanto el ISI como el INR se utilizan específicamente en el seguimien-

to de pacientes estabilizados en una terapia anticoagulante oral a largo plazo. La conversión a valores INR para pacientes que se encuentren en los primeros 10 días del tratamiento, si bien puede ser llevada a cabo suele ser menos precisa, dado que el nivel de factores de coagulación durante el primer período de tratamientos tiene fluctuaciones importantes. Tampoco es aplicable al estudio de deficiencias en factores de coagulación.

### Conclusión

El sistema INR ofrece claras ventajas en la estandarización del monitoreo de pacientes que reciben anticoagulantes orales, permitiendo minimizar la variabilidad de resultados entre diferentes laboratorios, reactivos y metodologías. Desde el punto de vista más general se puede decir también que la aceptación del sistema promueve una mayor comunicación y coincidencias sobre rangos terapéuticos óptimos al facilitar la comparación de estudios llevados a cabo en distintas partes del mundo.

### Bibliografía

- Barrow, D.A.; Maynard, J.R. - Lab-Medica IV/3:6, 1987.
- Suñer Casadevall, F. - Análisis Clínicos X/40:240, 1985.
- ICSH/ICTH Thrombosis and Haemostasis, pág. 155, 1985.
- WHO Expert Committee on Biological Standardization, WHO Technical Reports Series 610, 14, 1977.
- Spaethe, R. - Haemostasis, Physiology, Pathophysiology Diagnostics AHS/Deutschland GmbH, 1984.



### Errata

En NotiWiener N° 116, en el trabajo "Banco de Sangre: evaluación de kits diagnósticos", en los autores, donde aparece Silvina M., debe decir Silvina Molinari.