

REACCIONES DE AGLUTINACION AUTOMATIZADAS PARA LA DETECCION DE ANTIGENO AUSTRALIA, ANTICUERPOS ANTIPOLISACARIDOS DE *T. CRUZI* Y ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS FLAGELARES DE *SALMONELLA*¹

Carlos Augusto Pereira,² Igor Mimica Mimica² y Augusta Kiyomi Takeda³

Se describe un procedimiento que permite el procesamiento automatizado de muestras de sueros para detectar anticuerpos vinculados con la enfermedad de Chagas, la hepatitis y las infecciones debidas a Salmonella. Gracias a este procedimiento automatizado sería posible efectuar ahorros significativos de tiempo y esfuerzo en aquellos casos en que se debe procesar un gran número de muestras.

Introducción

Los trabajos que se describen en el presente artículo se realizaron con objeto de formular una técnica automatizada uniforme para efectuar varias evaluaciones serológicas que revisten importancia en esta parte del mundo. Se abriga la esperanza de que esta técnica permita realizar dichas evaluaciones con mayor rapidez y menor costo.

Ya se han descrito y utilizado algunas técnicas para la detección y análisis del antígeno Australia, los anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* y los anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella*. En su mayor parte estas técnicas son relativamente sencillas y producen resultados con un grado suficiente de especificidad y sensibilidad. Con todo, carecen de la velocidad que sería de desear en actividades en

las cuales se debe procesar un gran número de muestras, como en las investigaciones epidemiológicas o en los trabajos de selección sanguíneos realizados por los departamentos de serología de los bancos de sangre, a fin de impedir la transmisión de agentes mórbidos.

Con el objeto de formular una técnica más rápida se resolvió adaptar el equipo automatizado Technicon Autoanalyser, que ha sido diseñado para procesar reacciones serológicas para la detección de sífilis (8). Anteriormente otros grupos de investigadores habían estudiado y modificado este sistema automatizado con el fin de realizar pruebas uniformes adicionales (4, 6, 9). Este trabajo tuvo por objeto, en primer término, introducir algunas modificaciones operativas en el sistema y, segundo, adaptar dos pruebas (la prueba de hemaglutinación pasiva y la prueba de aglutinación bacteriana) al sistema modificado. Seguidamente, se realizaron pruebas de anticuerpos Australia, anticuerpo anti-*T. cruzi* y anticuerpo contra antígenos flagelares de *Salmonella*, con objeto de determinar si el sistema modificado podía realizar

¹ Se publica también en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization*, Vol. 12, No. 4, 1978.

² Profesor de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Médicas de Santa Casa de São Paulo, Brasil.

³ Inmunóloga, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

estas pruebas de manera confiable con más facilidad y rapidez que con las técnicas manuales.

Para la detección de anticuerpos antipolisacáridos de *T. cruzi* se realizaron pruebas de hemaglutinación pasiva automatizada, hemaglutinación pasiva manual y fijación del complemento manual, con muestras de sueros obtenidas de 60 sujetos con enfermedad de Chagas y 14 sujetos de control. La hemaglutinación pasiva automatizada se usó, también, para detectar el antígeno Australia en 50 muestras de suero de donadores de sangre, cuyos resultados se sometieron luego a una comparación cualitativa y cuantitativa con los de otras dos pruebas: la hemaglutinación pasiva manual y la contraímmunoelectroforesis. Además, los anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella* se analizaron mediante aglutinación bacteriana automatizada, y los resultados del procedimiento se compararon con los obtenidos con la técnica manual que comúnmente se usa con esta finalidad.

Materiales y métodos

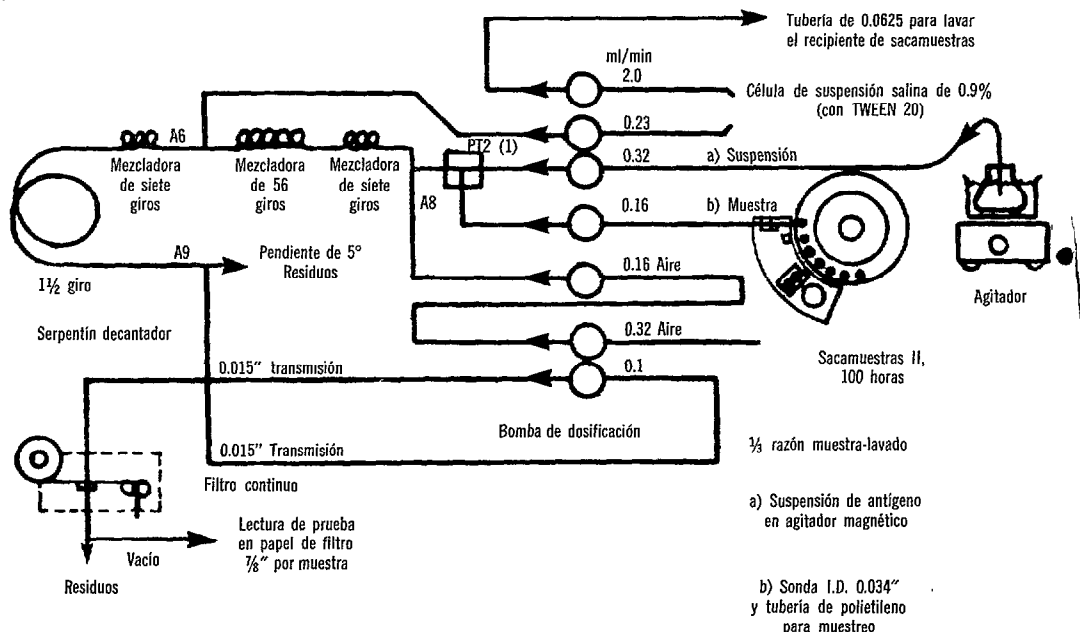
Equipo

En la figura 1 se muestra un diagrama del sistema Technicon modificado que se utilizó para realizar todas las pruebas automatizadas.

Pruebas de aglutinación bacteriana

En las pruebas de aglutinación bacteriana, manuales y automatizadas, se emplearon 197 muestras de suero provenientes de donadores de sangre normales. Todas las muestras de suero se recolectaron en condiciones asépticas y se mantuvieron a una temperatura inferior a -20°C hasta el momento de su utilización. Treinta y nueve de estas muestras de sueros se probaron contra el antígeno flagelar b de *Salmonella paratyphi* B; 43 contra el antígeno flagelar i de *Salmonella aberdeen*; 35 contra el antígeno flagelar 1.2 de *Salmonella morotai*; 39 contra el antígeno flagelar mt de

FIGURA 1—Flujograma de las operaciones realizadas con el equipo modificado que se utilizó en las pruebas automatizadas.



Salmonella oranienburg, y 41 contra el antígeno flagelar d de *Salmonella typhi*.

Como antígeno se emplearon salmone-las suspendidas en formaldehído. En las pruebas manuales se utilizaron antígenos sin colorear; en cambio, para las pruebas automatizadas los antígenos se colorearon del siguiente modo: se añadió cristal violeta (0.2 ml) a 10 ml de antígeno, y la mezcla se centrifugó cuatro veces, a 5,000 rpm durante 15 minutos cada vez. El producto final se resuspendió en 5 ml de una solución salina al 0.9% que contenía fucsina básica al 1%.

Las pruebas automatizadas se realizaron con el equipo antes mencionado (figura 1) y las manuales mediante la combinación de sueros y antígenos suspendidos en placas y observando la ocurrencia de aglutinación.

Pruebas de hemaglutinación pasiva

En las pruebas de hemaglutinación pasiva, utilizadas para detectar anticuerpos de *T. cruzi* y antígeno Australia, se emplearon eritrocitos humanos tratados con formaldehído y ácido tánico. Los eritrocitos utilizados para el anticuerpo de *T. cruzi* (obtenidos de sangre tipo O, factor Rh negativo), se sensibilizaron con antígeno de *Trypanosoma* polisacárido; mientras que los empleados en las pruebas del antígeno Australia se obtuvieron en forma de un producto sensibilizado y liofilizado (Hepanosticon® obtenido del laboratorio comercial Organon Ltda (5). Este último producto se utilizó al doble de la concentración recomendada en las pruebas automatizadas y a la concentración recomendada en las pruebas manuales.

Ambos conjuntos de pruebas automatizadas se realizaron con el equipo antes mencionado (figura 1). En las pruebas de hemaglutinación manual de anticuerpo de *T. cruzi* se emplearon placas de microtitulación de acuerdo con la técnica descrita por Takeda et al. (7). En las pruebas del

antígeno Australia se empleó la técnica normalizada por Organon Ltda; aparte de la concentración de eritrocitos, en las pruebas manuales y automatizadas del antígeno Australia se utilizaron los mismos reactivos.

Pruebas de fijación del complemento para anticuerpo de T. cruzi

Esta prueba se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Almeida (1). En este método se evalúan las reacciones en términos del suero (o antígeno) necesario para producir una lisis de 50%, como lo indica un par de curvas isohemolíticas trazadas mediante coordinadas aritméticas. La técnica se ha descrito en su totalidad en el trabajo original. Los reactivos empleados en esta prueba, incluyendo el antígeno metílico, el complemento, los eritrocitos y la hemolisina, se obtuvieron de los proveedores usuales de estos productos.

Contrainmunolectroforesis para detectar el antígeno Australia (CIE)

Esta prueba se realizó en placas de agar gelatina con la técnica, los reactivos y el equipo comunes especificados por la Hyland Division de Travenol Laboratories (3).

Resultados

Los resultados de las pruebas manuales y automatizadas de hemaglutinación para anticuerpo de *T. cruzi* fueron idénticas. En el cuadro 1 se presenta una comparación de estos resultados con los obtenidos mediante la fijación manual del complemento de las mismas muestras de sueros.

En el cuadro 2 se muestran los resultados cualitativos de las tres clases de pruebas realizadas para detectar el antígeno

CUADRO 1—Comparación de los resultados cualitativos obtenidos con pruebas automatizadas y manuales de hemaglutinación pasiva y fijación del complemento de anticuerpos antipolisacáridos de *T. cruzi*

	Números total de sueros	Hemaglutinación automatizada y manual		Fijación del complemento	
		+	-	+	-
		Sueros de pacientes con enfermedad de Chagas	60	56	4
Sueros de sujetos de control	14	0	14	0	14

Australia. Asimismo, se efectuó una comparación cuantitativa de títulos obtenidos con nueve sueros, cuyos resultados se indican en el cuadro 3. A fin de evitar reacciones positivas falsas, todas las muestras de sueros puestas a prueba se sometieron a un tratamiento ulterior con Heapanosticon® absorbente y a continuación fueron nuevamente probadas contra eritrocitos sensibilizados con anticuerpos contra el antígeno Australia. Este procedimiento no reveló ninguna reacción positiva falsa ni títulos inferiores a los registrados previamente.

En el cuadro 4 se indican los resultados de los dos conjuntos de pruebas de aglutinación bacteriana realizados para detectar anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella*.

Discusión

Pruebas de hemaglutinación

Se han descrito distintas técnicas con el objeto de facilitar la detección del antígeno Australia y los anticuerpos contra *T. cruzi*. Se ha observado, sin embargo, que se plantean dificultades cuando algunas dependencias, como los departamentos de serología de bancos de sangre, deben procesar un gran número de muestras. A juicio de los autores, esas necesidades se pueden satisfacer de manera óptima con la hemaglutinación pasiva automatizada.

Analizando los resultados obtenidos hasta la fecha se llega a la conclusión que la prueba de hemaglutinación pasiva automatizada para la detección de anticuerpo

CUADRO 2—Comparación de los resultados cualitativos obtenidos con pruebas automatizadas y manuales de hemaglutinación pasiva y contraelectroforesis de antígeno Australia.

	Número de sueros	Pruebas de hemaglutinación pasiva			
		Automatizadas		Manuales	
		+	-	+	-
Positivas por CIE ^a	40	39	1	39	1
Negativas por CIE ^a	10	2	8	1	9

^a Contraelectroforesis.

CUADRO 3—Comparación de títulos obtenidos mediante el ensayo de nueve muestras de sueros de antígeno Australia con hemaglutinación pasiva automatizada y manual y contraelectroforesis.

Número de la muestra de suero	Títulos obtenidos de:		
	Contraelectroforesis	Hemaglutinación pasiva automatizada	Hemaglutinación pasiva manual
1	4	16	16
2	4	16	8
3	8	8	8
4	16	64	16
5	16	64	16
6	16	32	32
7	32	32	16
8	32	32	32
9	64	64	32

CUADRO 4—Comparación de los resultados cualitativos obtenidos con pruebas automatizadas y manuales de aglutinación de anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella*.

Antígeno flagelar de <i>Salmonella</i>	Número de sueros probados	Resultados de las pruebas			
		Aglutinación manual		Aglutinación automatizada	
		+	-	+	-
b	39	28	11	26	13
i	43	33	10	32	11
1.2	35	30	5	30	5
mt	39	18	21	16	23
d	41	21	20	19	22
Total	197	130	67	123	74

anti *T. cruzi* y antígeno Australia es específica, muy precisa y sumamente rápida. Respecto de este último punto, cabe decir que el equipo puede efectuar 100 determinaciones por hora, en tanto que por los métodos manuales se requiere tres o más horas para realizar la misma tarea. Esta diferencia reviste importancia cuando se deben procesar muchas muestras.

Si bien se debe obrar con cuidado al preparar eritrocitos para la prueba de anticuerpo de *T. cruzi*, el procedimiento no es difícil. En cuanto a la prueba de antígeno Australia, es de señalar que la disponibili-

dad de eritrocitos preparados comercialmente coadyuva a asegurar tanto la exactitud deseada como la reproductibilidad ulterior de los resultados.

Los resultados de ambas pruebas automatizadas se pueden interpretar con más facilidad y precisión que los de las pruebas manuales, por cuanto la reacción positiva produce una coloración marrón oscura en la cinta de papel de filtro que se distingue con facilidad de la reacción negativa.

En general, los autores estiman que estas técnicas de hemaglutinación automatizada se adaptan bien a las necesidades de los

servicios de serología de los bancos de sangre que quieren prevenir la transmisión de enfermedades de los donadores de sangre, como la enfermedad de Chagas y la hepatitis sérica. Asimismo, se estima que otras técnicas de hemaglutinación se pueden adaptar de manera efectiva al sistema automatizado empleado.

Aglutinación bacteriana

Con las pruebas automatizadas de anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella* se obtuvieron resultados análogamente favorables, esto es, se observó que la técnica era precisa, específica y rápida, y que permitía hasta 100 determinaciones por hora. Por lo común, con los métodos manuales se requiere aproximadamente el doble de ese tiempo para efectuar 100 determinaciones. Como en los casos anteriores, este ahorro en tiempo parecería constituir una ventaja importante en actividades tales como las investigaciones epidemiológicas, en las cuales se debe efectuar un gran número de determinaciones. La preparación de antígeno coloreado antes descrita para esta prueba automatizada es un procedimiento muy sencillo que no involucra una pérdida significativa de eficiencia o tiempo.

También en este caso los resultados se pueden interpretar fácilmente y con más precisión que los de las pruebas manuales; los resultados positivos colorean el papel de filtro con una tonalidad azul y los resultados negativos con una tonalidad roja.

Consideraciones finales

Con relación a los costos de laboratorio del equipo automatizado, la experiencia en el procesamiento de un gran número de muestras ha indicado que los ahorros de

tiempo y horas-hombre justifican los costos respectivos. Los autores estiman que se podrán formular técnicas automatizadas similares para detectar anticuerpos contra otros agentes mórbidos. Se proyecta continuar los trabajos que se describen en el presente artículo con un estudio cuantitativo de las pruebas descritas y, además, con la investigación de otros sistemas antígeno-anticuerpo, con la finalidad de promover la investigación y los trabajos de evaluación que ahora se ven obstaculizados por la dificultad de procesar grandes números de muestras.

Resumen

En el presente artículo se describen la formulación y puesta a prueba de un sistema automatizado para detectar antígeno Australia, anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella*. Las técnicas básicas utilizadas fueron la hemaglutinación pasiva en los dos primeros casos y la aglutinación bacteriana en el tercero. En los tres procedimientos se empleó una versión modificada del equipo automatizado que actualmente se destina a la detección de sífilis.

Los ensayos pusieron de manifiesto que los nuevos métodos automatizados producían rápidamente resultados específicos y de fácil interpretación. Estas pruebas se realizaron con sueros de 50 donadores de sangre para la detección del antígeno Australia, sueros de 60 pacientes con enfermedad de Chagas y 14 sujetos de control para la detección del anticuerpo de *T. cruzi* y sueros de 197 donadores de sangre para la detección de anticuerpos contra antígenos flagelares de *Salmonella*. Se concluyó que las nuevas técnicas tienen ventajas definidas cuando se procesan gran número de muestras y que, al parecer, son apropiadas para las actividades de selección en los bancos de sangre y en las investigaciones epidemiológicas. □

Agradecimiento

Los autores desean manifestar su agradecimiento a Technicon Instrumentos do Brasil

Ltda., que hizo posible estos trabajos mediante el préstamo de su equipo automatizado.

REFERENCIAS

- (1) Almeida, J. O. Reação ee fixação de complemento em gotas sobre placas, pelo método das curvas iso-hemolíticas. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5(4):176-189, 1963.
- (2) Edwards, P. R. y W. H. Ewing. *Identification of Enterobacteriaceae*, 3ª edición. Minnesota: Burgess Publishing Co., 1972. Págs. 174-176.
- (3) Product information pamphlet. Hyland Division, Travenol Laboratories. California: Costa Mesa, 1976.
- (4) Nelson, M., E. J. Phipps, P. G. Watson, J. R. Watts y R. Zwoleski. An automated passive haemagglutination technique suitable for the detection of hepatitis B virus antigen and antibody in blood donors. *J Clin Pathol* 26:343-350, 1973.
- (5) Product information pamphlet. Organon Technika. Oss, Holanda, 1976.
- (6) Schroeter, A. L., H. F. Taswell y M. A. Sweatt. Adaptation of the single-channel automated reagin test for syphilis to a multi-channel automated blood grouping machine. (Technicon) *Adv Autom Anal* 1:265-269, 1969.
- (7) Takeda, A. K., A. E. Taunay, L. G. P. Scalabrini e I. O. Castro. Anticorpos anti-polissacarídeos C de *Neisseria meningitidis*: detecção através da hemaglutinação passiva em soros de pacientes e de vacinados. *Rev Inst Adolfo Lutz* 34:127-133, 1974.
- (8) Technical equipment information. Technic Corporation. New York: Tarrytown, 1976.
- (9) Trinquier, M. y M. Morel. Application simplifiée de la méthode de Vargues pour le dosage de routine des antistreptolysines (A.S.L.). *Autom Chim Anal* 2:357-359, 1966.

Automated agglutination reactions for detection of Australia antigen, *T. cruzi* antipolysaccharide antibodies, and anti-*Salmonella* flagellar antibodies (Summary)

This article describes the development and testing of automated systems for detecting Australia antigen, antibodies against *Trypanosoma cruzi*, and anti-*Salmonella* flagellar antibodies. The basic techniques used were passive hemagglutination in the first two instances and bacterial agglutination in the third. All three procedures employed a modified version of automated equipment currently used to detect syphilis.

Trials indicated that the new automated methods provided specific, easily readable, and

rapid results. These trials were conducted with sera from 50 blood donors for detection of Australia antigen, sera from 60 Chagas' disease patients and 14 control subjects for detection of antibody against *T. cruzi*, and sera from 197 blood donors for detection of anti-*Salmonella* flagellar antibodies. It was concluded that the new techniques offer definite advantages if large numbers of samples are being processed, and that they seem well-suited to use in blood bank screening activities and epidemiologic investigations.

Reações de aglutinação automatizadas para detecção do antígeno Austrália, anticorpos antipolissacarídeo de *T. cruzi* e anticorpos flagelares anti-*Salmonella* (Resumo)

Neste artigo descrevem-se a formulação e submissão à prova de um sistema automatizado para detectar antígeno Austrália, anticorpos

contra *Trypanosoma cruzi* e anticorpos flagelares anti-*Salmonella*. As técnicas básicas que se usaram foram a hemaglutinação passiva nos dois

primeiros casos e a aglutinação bacteriana no terceiro. Nos três procedimentos usou-se uma versão modificada do equipamento automatizado que se emprega atualmente na detecção da sífilis.

Os testes realizados mostram que os novos métodos automatizados produzem rapidamente resultados específicos e de interpretação fácil. Fizeram-se os testes com soros de 50 doadores de sangue para a detecção do antígeno Austrália; soros de 60 pacientes com

doença de Chagas e 14 sujeitos de controle para a detecção do anticorpo de *T. cruzi*; e soros de 197 doadores de sangue para a detecção de anticorpos flagelares anti-*Salmonella*. Chegou-se à conclusão que as novas técnicas oferecem vantagens definitivas quando se processam grandes números de amostras e que parecem ser de uso apropriado para as atividades de seleção tanto nos bancos de sangue como nas pesquisas epidemiológicas.

Automatisation des réactions d'agglutination pour la détection d'antigène Australie, d'anticorps anti-polisaccharides de *T. cruzi* et anti-flagelle de *Salmonella* (Résumé)

Dans cet article sont décrits la technique et les essais de systèmes automatisés pour mettre en évidence la présence d'antigène Australie, d'anticorps anti-*Trypanosoma cruzi* et anti-flagelle de *Salmonella*. Les techniques de base employées ont été, dans les deux premiers cas, l'hémagglutination passive, et dans le dernier cas, l'agglutination bactérienne. Toutes les mesures ont été faites à l'aide d'une version modifiée de l'équipement automatisé employé pour la détection de routine de la syphilis.

Ces nouvelles méthodes automatisées fournissent des résultats rapides, spécifiques et

d'une interprétation facile. Les essais ont été faits sur 50 sérums pour la détection d'antigène Australie, sur un échantillon de 60 sérums pour la maladie de Chagas, le lot témoin étant constitué par 14 individus normaux, et sur le sérum de 197 donneurs pour la détection d'anticorps anti-flagellaires de *Salmonella*. Il est conclu que ces nouvelles techniques offrent des avantages certains si le nombre d'échantillons à analyser est considérable, et qu'elles semblent propres au triage des banques de sang et aux enquêtes épidémiologiques.