ARTICULOS SOBRE TECNICAS/ PAPERS ON TECHNIQUES

TITULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE INTERFERON UTILIZANDO EL SISTEMA DE EQUIPOS "SUMA"

Joel Ferrero[1], María Elena Ochagavía[2], Angel Aguilera[1] y Pedro López-Saura[1]

[1]*Centro de Investigaciones Biológicas, Apartado Postal 6996, La Habana 6, C.P.10600, Cuba.* [2]*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Apartado Postal 6162, La Habana 6, C.P. 10600, Cuba.*

Recibido en marzo de 1993. Aprobado en enero de 1994

Key words: interferon, titration, SUMA

SUMMARY

The determination of the antiviral activity of interferons by the inhibition of the cytopathic effect produced by a virus on a given cell line is a common procedure in all laboratories working with these products. For this purpose 96-well plates are used, where a cell monolayer is infected by a virus and the degree of cell destruction is measured by fixation and staining, generally with violet cristal. The color is read visually in most cases. Therefore, the results have an important subjective component. In this paper we show the use of the fotometer from the cuban Ultramicroanalytical System (SUMA) for reading the cytopathogenic effect in the dry wells. A computer program in Pascal UCSD language was developed for calculations and corrections. The procedure is shown to be precise and the results equivalent, not only to the visual reading but also to other procedures like hemagglutination inhibition.

RESUMEN

La determinación de la actividad antiviral de interferones mediante la inhibición del efecto citopatogénico producido por un virus en una línea celular es un procedimiento muy difundido en todos los laboratorios que trabajan con estos productos. Para ésto se usan placas de cultivo de 96 pozuelos, donde una monocapa celular se infecta con el virus y el grado de destrucción celular se mide mediante fijación y tinción de las células remanentes, generalmente con cristal violeta. La lectura de la coloración se hace normalmente en forma visual por lo que tiene un componente subjetivo importante. En este trabajo se empleó el fotómetro del Sistema Ultramicroanalítico cubano (SUMA) para las lecturas del grado de efecto citopatogénico en los pozuelos secos y se desarrolló un programa en lenguaje Pascal UCSD para todos los cálculos y correcciones empleando la microcomputadora que forma parte del sistema. Se demostró que el procedimiento es preciso y los resultados equivalentes, no sólo a la lectura visual, sino también a otros procedimientos como la inhibición de la hemaglutinación.

INTRODUCCION

La determinación de la actividad antiviral de interferón (IFN) es una técnica necesaria en los laboratorios que trabajan con estas moléculas para propósitos como el control y desarrollo de procesos de producción, la determinación de niveles de IFN endógeno, así como la capacidad de producción de estas sustancias en individuos sanos y enfermos, el control de tratamientos con IFNs, la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes de la actividad antiviral, y otras investigaciones relacionadas con la producción y el mecanismo de acción de los IFNs. Todos los problemas anteriormente relacionados requieren un método de determinación confiable, seguro, y rápido. Tradicionalmente se han empleado los métodos de reducción de placas clásicos en la virología. Sin embargo, estas técnicas son demoradas y consumen cantidades importantes de reactivos, además de producirse errores en el conteo de las placas.

Desde hace casi 20 años se introdujo el uso de la captación de colorantes vitales para medir la inhibición del efecto citopatogénico (ECP) producida por IFN (Finter, 1969). Posteriormente se introdujo el uso de placas de microtitulación para facilitar la manipulación y lectura del procedimiento anterior (McManus, 1976), aunque se mantuvo la dilución de las muestras de una forma demasiado laboriosa. Más recientemente se han venido empleando procedimientos de microtitulación con diluciones en la misma microplaca que resultan más eficientes (Famillietti *et al.*, 1981). Pero estos métodos, que se

Copyright © 1994, Sociedad Iberolatinoamericana de Biotecnología Aplicada a la Salud
La Habana, Cuba

han generalizado en los últimos años, se basan en la determinación, mediante lectura visual, del punto correspondiente al 50% de inhibición del ECP. Esta lectura visual tiene un componente subjetivo muy grande, por lo que puede introducir errores de exactitud y precisión.

En la literatura han aparecido trabajos que realizan esta lectura de forma automática, pero después de la disolución del colorante (Forti *et al.*, 1986) lo que significa un paso más de manipulación. Además, se determina el valor de dilución para el cual la protección alcanza el 50% teniendo en cuenta solamente el valor de un punto de la determinación, despreciándose el comportamiento de las restantes diluciones de la muestra.

El sistema SUMA (Centro de Inmunoensayo, Ciudad de la Habana, Cuba) está concebido para el uso fácil y rápido de mediciones de luz en transmisión, absorbancia, fluorescencia o nefelometría en volúmenes muy pequeños, pudiendo realizar 96 mediciones en menos de un minuto. La facilidad de su operación consiste en que es ejecutada por una microcomputadora que controla los parámetros, opera el sistema, calcula e imprime los resultados, evitando al máximo los errores y prolongadas acciones del operador.

En este trabajo se presentan los resultados de utilizar el fotómetro del sistema SUMA para leer la coloración de los pozuelos secos de las placas de titulación de la actividad antiviral y el cálculo del título de IFN mediante un programa en lenguaje Pascal UCSD, que tiene en cuenta todos los puntos de diluciones de las muestras en la microplaca.

MATERIALES Y METODOS

Células, virus y preparaciones de IFN

Se utilizaron células HEp-2 (ATCC No. CCL 23) multiplicadas en medio MEM suplementado con 10% de suero de ternera fetal, 2.2 mg/mL de bicarbonato de sodio y 40 μg/mL de gentamicina, e incubadas a 37°C y 3% de CO_2. Las células se emplearon después de 3 a 10 pases.

Como virus productor de ECP se utilizó el Mengo (cepa del Instituto de Biología Molecular, Universidad de Zurich, 1982), multiplicado en fibroblastos de ratón L929.

Las muestras de IFN humano usadas fueron de varios orígenes: IFN alfa leucocitario crudo y semipurificado (Centro de Investigaciones Biológicas, Ciudad de la Habana), obtenidos según el método de Cantell (Cantell et al., 1981a y b); IFN alfa-2b recombinante obtenido en E. coli y purificado por cromatrografía de inmunoafinidad con anticuerpos monoclonales (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ciudad de la Habana). También se probaron muestras de sueros de pacientes bajo tratamiento con IFN. Como referencia se tomaron patrones secundarios de laboratorio calibrados contra el internacional Ga23-902-530 (NIH, 1984) para IFN alfa.

Procedimiento de titulación de la actividad antiviral de IFN

Se sembraron 2 x 10^4 células/pozuelo en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozuelos (Costar, USA) en el medio descrito anteriormente. A las 48 h, una vez formada la monocapa, se sustituyó el medio por 100 μL de diluciones seriadas de las muestras que contienen el IFN a cuantificar. Las diluciones de las muestras se realizaron en el mismo medio de incubación pero con 2% de suero fetal. Se incubó 24 h en las mismas condiciones.

Seguidamente se sustituyeron las muestras, previo lavado con solución salina tamponada, por la preparación de virus Mengo (10^{-7} $DICT_{50}$/mL) y se incubó 18 h hasta la aparición del ECP. En cada placa y en posiciones fijas se colocaron controles de células no infectadas (control de células), de células infectadas y no tratadas con IFN (control de virus), y diluciones seriadas del patrón de referencia con una actividad de 160 UI/mL. La disposición de las muestras en la placa se presenta en la figura 1.

Terminada la incubación, las células se fijaron y tiñeron con una solución alcohólica de cristal violeta al 0.75%. El exceso de colorante se lavó exhaustivamente con agua corriente y las placas se secaron en un horno a 40°C. Seguidamente se leyó la absorbancia con el fotómetro del SUMA a 570 nm.

Alternativamente, en algunos experimentos, se midió la actividad por la hemaglutinación de eritrocitos humanos O + producida por el virus Mengo. Para ésto, el virus Mengo inoculado en las placas se retiró al cabo de las 2 h de incubación, se lavó con medio y se incubó de nuevo alrededor de 18 h en las mismas condiciones descritas, hasta la aparición del ECP. Se congelaron y descongelaron las placas 3 veces, se hicieron diluciones seriadas 2X de cada pozuelo en tampón borato 0.05 M pH 7.0. Se añadieron 50 μL de eritrocitos al 0.8% (v/v) en tampón borato a cada pozuelo, se incubó 1 h a temperatura ambiente y se observó la presencia o ausencia de hemaglutinación.

Definición de la unidad

Se define como una unidad de actividad antiviral a la cantidad de IFN que produce una inhibición del 50% de la replicación viral, de los productos de la infección o de sus efectos. Cuando se reveló la actividad por la inhibición del ECP por tinción de las células, el título de IFN estuvo dado por la dilución de la muestra que produjo una protección del 50% de las células. Cuando se reveló por hemaglutinación, el título de IFN fue la dilución de la muestra que redujo el título hemaglutinante del virus 8 veces. Las distintas formas de expresar esta actividad se hacen equivalentes al referirlas a una muestra patrón internacional.

Cálculo de los valores de actividad

El cálculo de los valores de actividad se hizo empleando un programa escrito en lenguaje Pascal UCSD, para una microcomputadora acoplada al lector de absorbancia. Se requiere un mínimo de 64 Kbytes de memoria interna, una torre de discos flexibles y una impresora.

Los valores de absorbancia de las muestras fueron captados por un procedimiento que forma parte del paquete de programas que acompañan al SUMA.

1) El programa comienza haciendo un análisis de errores groseros de los controles de virus y de células entre sí.

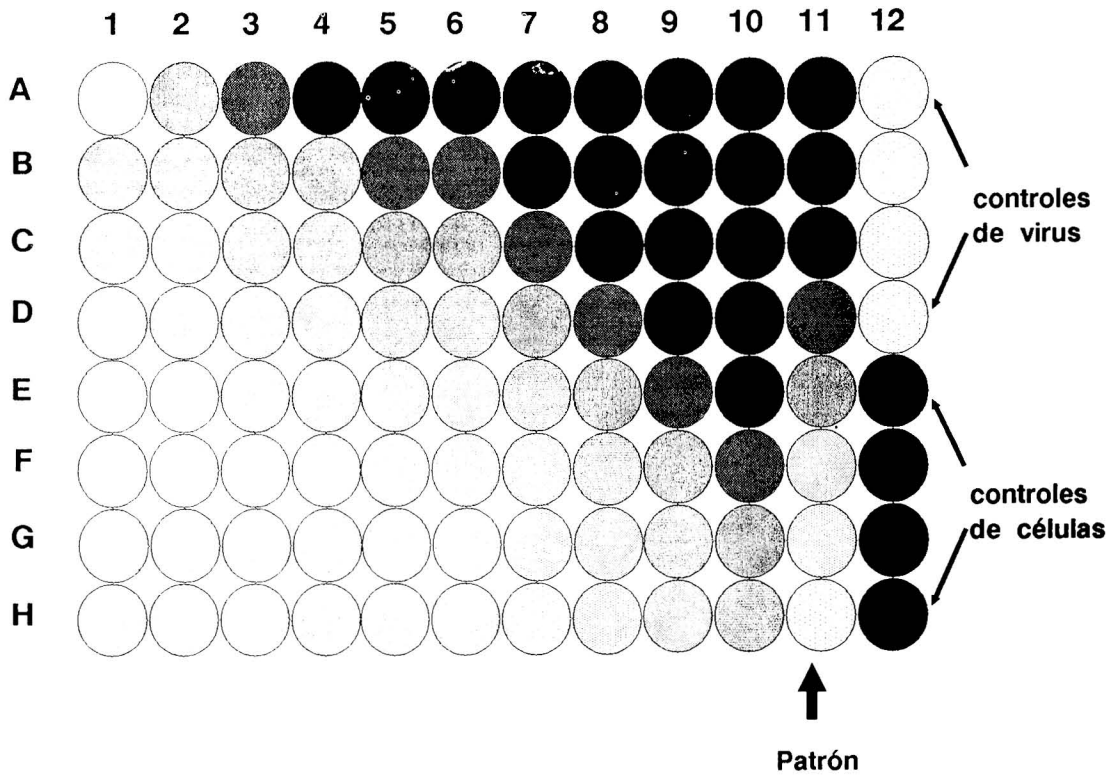

Fig. 1: Disposición de las muestras en la placa de 96 pocillos. Cada columna corresponde con una muestra. Estas se diluyen según un factor constante (generalmente 2) de la fila A a la H. Las columnas 1-10 se usan en muestras desconocidas. La columna 11 se utiliza para la muestra patrón de referencia. En la columna 12 las células de las filas A-D no se tratan previamente con IFN y se infectan con el virus Mengo (controles de virus; máximo de efecto citopatogénico y lectura 0); las células de las filas E-H no se tratan con IFN ni se infectan con el virus Mengo (controles de células; no sufren destrucción por el virus y lectura 100). La posición A1 queda vacía para ser usada como blanco de calibración del fotómetro.

Sean xi, $1 \leq i \leq N$, $1 \leq N \leq 4$ los valores de absorbancia de los controles de virus o de células. Entonces se tienen en cuenta aquellos xi tales que :

$$(x_i - \bar{x}) \leq 1.3S$$

donde, $\bar{x}$ es la media de las absorbancias de los controles de virus o de células y S la desviación estándar.

Si se elimina más de un punto, no continúa el análisis de la placa en cuestión, considerándose que los controles no son adecuados.

2) Seguidamente se normalizan los valores de absorbancia de las muestras con respecto al rango que queda definido entre la media de los controles de virus (v) y la de los controles de células (c).

Sea a_{ij} el valor de absorbancia para la j-ésima dilución de la muestra i.

Los valores de a_{ij} normalizados (α_{ij}) se obtienen según la siguiente fórmula:

$$\alpha_{ij} = \frac{a_{ij} - v}{c - v} x\, 100$$

3) La curva que resulta al relacionar las absorbancias normalizadas (α_{ij}) con el logaritmo de las diluciones tiene un comportamiento sigmoidal. Esta relación se hace lineal al aplicar a cada valor α_{ij} la transformación PROBIT (Y_{ij}) definida por Finney (1952).

$$\alpha_{ij} = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{Y_{ij} - 5} e^{-1/2 u^2} du$$

siempre que $1 \leq \alpha_{ij} \leq 99$.

4) A continuación se calcula para cada muestra i la recta de regresión.

$$Y_i = m_i X_i + b_i$$

donde m_i es la pendiente de la recta y b_i el intercepto con el eje Y.

5) El título (t_i) o concentración de IFN en la muestra i es:

$$t_i = e^{(5 - b_i)/m_i \ln(f)}$$

donde f es el factor de dilución seriada utilizado entre dos pozuelos consecutivos (generalmente, f = 2).

6) Por último se hace una corrección (t_i^c) de t_i según el título que se haya obtenido para el patrón de concentración conocida (t_i^s), que se diluyó de forma tal que su valor esperado fuera de 16 UI/mL.

$$t_i^c = \frac{t_i \; x \; 16}{t_i^s}$$

Análisis estadísticos

Para las comparaciones entre series de valores se utilizó la prueba t de Student para series apareadas. Se calcularon además coeficientes de regresión y correlación para las comparaciones entre métodos.

RESULTADOS

Comparación entre lecturas secas y en solución

Para comprobar si la lectura de la placa seca es equivalente a la que se obtiene después de disolver el colorante fijado a las células, se leyó una placa antes y después de disolver el colorante con metanol. La figura 2 muestra la correlación entre las lecturas de absorbancia. Se obtuvo una correlación satisfactoria (r=0.97), pero con una ligera pérdida de sensibilidad en la lectura (b=0.83). Sin embargo, cuando se calcularon los títulos de actividad antiviral correspondientes (tabla 1), se obtuvieron resultados

Tabla 1

Títulos obtenidos en las muestras de IFN alfa leucocitario crudo después de leer las muestras secas y disolver el colorante de cada pozuelo de la placa con metanol

Muestras	Títulos obtenidos después de leer las muestras secas	Títulos obtenidos después de disolver el colorante
1	14.0	7.9
2	5.4	1.9
3	16.9	13.9
4	8.1	7.9
5	12.1	13.2
6	6.9	8.7
7	10.2	12.2
8	5.9	4.8
9	25.8	16.7
10	4.4	3.5
Patrón	16.0	16.0

Estadígrafo "t" (para series apareadas) = 0.585064. La diferencia entre las series no es significativa

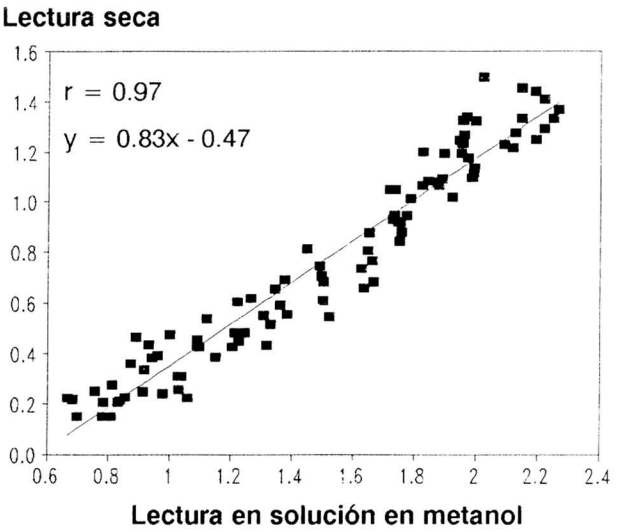

Fig. 2: Correlación entre las lecturas obtenidas antes y después de disolver el colorante de la tinción de las células con metanol. El procedimiento de titulación se efectuó en una placa de células HEp-2 tal como se describe en Materiales y Métodos. Después de teñidas las células y secada la placa, se leyó la absorbancia de cada pozuelo en el equipo SUMA. Seguidamente se añadieron 100 μL de metanol en cada pozuelo. Se esperó a la disolución total del colorante (aproximadamente 15 min) y se leyó de nuevo la misma placa.

Tabla 2

Lecturas de la coloración de la monocapa en las diferentes posiciones de la placa de 96 pocillos. Valores de extinción obtenidos en el SUMA para una monocapa de células Hep-2 teñidas con cristal violeta. La posición A1 queda siempre vacía para ser usada como blanco de calibración del equipo.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1.336	1.365	1.412	1.459	1.454	1.473	1.460	1.439	1.395	1.379	1.209
B	1.176	1.288	1.355	1.396	1.427	1.447	1.459	1.486	1.516	1.492	1.433	1.265
C	1.31	1.34	1.377	1.373	1.442	1.454	1.448	1.497	1.494	1.487	1.396	1.269
D	1.268	1.269	1.337	1.324	1.424	1.448	1.425	1.415	1.421	1.385	1.346	1.293
E	1.213	1.26	1.301	1.33	1.335	1.332	1.314	1.366	1.373	1.311	1.259	1.259
F	1.213	1.271	1.29	1.26	1.252	1.227	1.262	1.305	1.249	1.261	1.25	1.22
G	1.188	1.249	1.189	1.23	1.242	1.22	1.208	1.208	1.215	1.226	1.253	1.247
H	1.003	1.1	1.012	1.016	0.956	0.998	1.014	1.053	1.033	1.071	1.052	1.038

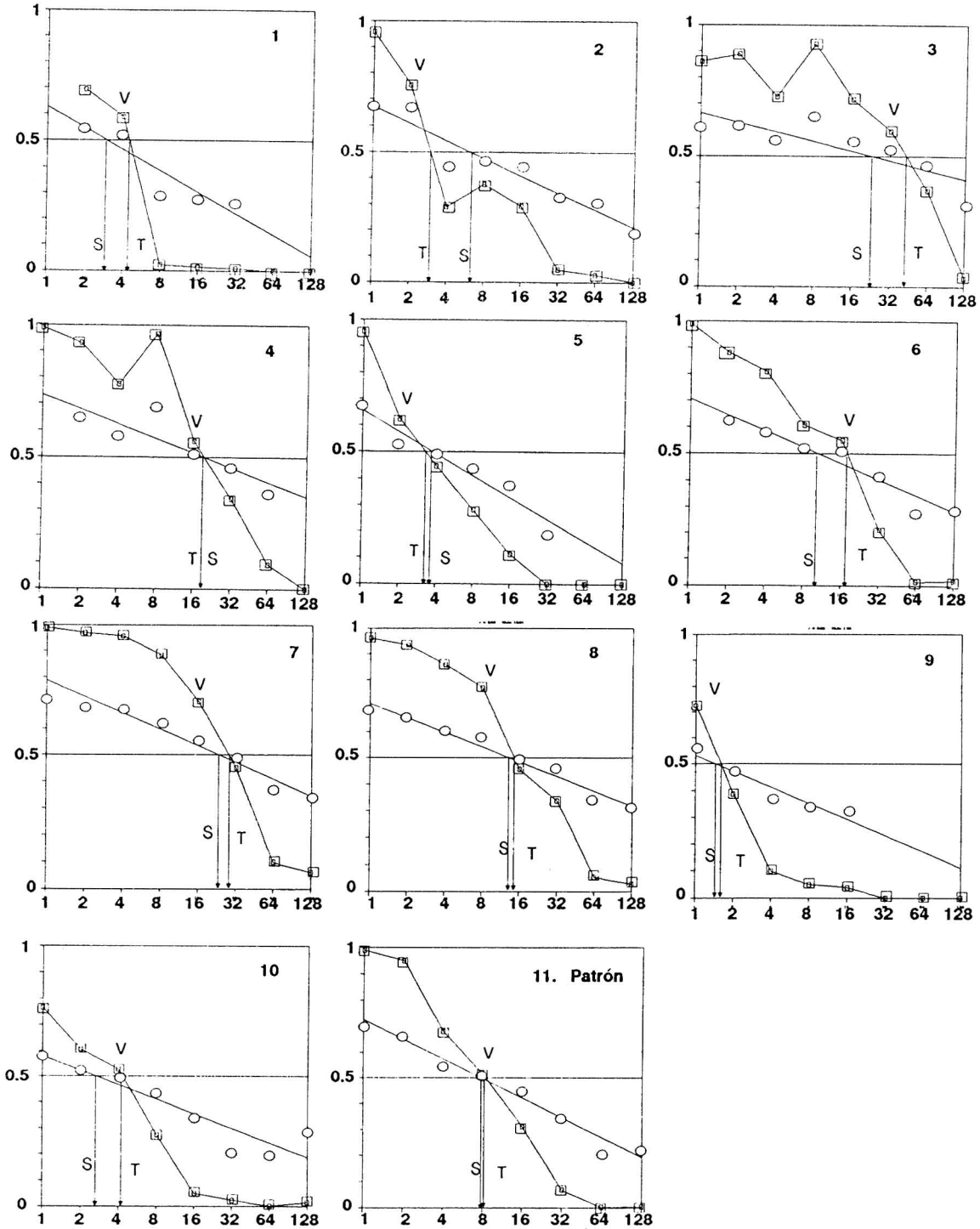

Fig. 3: Comparación del cálculo de los títulos de actividad antiviral después de la transformación PROBIT con la lectura directa. Los 11 gráficos representan las 11 columnas de titulación (fig 1): 10 muestras y el patrón. Las abscisas son las diluciónes 2x que sufre cada muestra desde la fila A a la H. La ordenada es la lectura normalizada (tomando como 0 al promedio de los controles de virus y como 1 al promedio de los controles de células) tomada directamente (cuadros) o después de la transformación PROBIT (círculos). Las líneas corresponden a: línea del 50% de protección (lectura 0.5), línea que une los valores de las lecturas directas y línea de regresión de los valores PROBIT. Las flechas indican, en la abscisa, los títulos obtenidos mediante cada procedimiento de cálculo: lectura en el SUMA y regresión de los valores despues de la transformación PROBIT (S); interpolación a partir de los dos valores que quedan inmediatamente por encima y por debajo de 0.5 (T) y la dilución mayor, que, por lectura visual proporcionaría una protección del 50% (V).

para ambos tipos de lectura que no difirieron significativamente ($t=0.585$, $p>0.5$ para 10 grados de libertad). Esto se explica porque las lecturas de la muestra de referencia se alteran de la misma manera que las de las muestras problemas.

Repetibilidad de la lectura en distintas posiciones de la placa

La tabla 2 muestra los valores de absorbancia obtenidos para una misma monocapa de células en 95 posiciones distintas de la placa. Se observa que el coeficiente de variación para toda la placa fue del 10.4%. Las lecturas en las columnas extremas de la placa fueron 10% menores que en el centro. Este fenómeno ocurre siempre y se debe a que en los extremos hay más afectaciones ambientales en el cultivo (pérdida de humedad, cambios de pH) que causan ligeramente menor crecimiento celular.

Validez de la transformación PROBIT

En la figura 3 se observan los resultados del cálculo de los títulos de actividad antiviral después de la lectura fotométrica de la coloración de los pocillos de una placa. En todos los casos se compara la recta de regresión obtenida después de la transformación PROBIT con los valores de absorbancia directa (que corresponderían a una lectura visual **perfecta**). Los coeficientes de correlación obtenidos fueron mayores que 0.95 en 7 de las 11 titulaciones, indicando buena linealidad después de la transformación. En los 4 casos restantes, hay pocillos cuya lectura se aleja considerablemente de la curva. Esto pudo estar ocasionado por lecturas en el rango muy bajo de absorbancia (figura 3.1 y 3.10) o por alteraciones de la coloración en un pocillo (figura 3.3 y 3.4).

Tabla 3

Títulos obtenidos por cálculo en el SUMA mediante transformación PROBIT, lectura visual e interpolación de 2 puntos. Las muestras se corresponden con las de la figura 3.

Muestra	Método de lectura y cálculo		
	SUMA y transformación PROBIT	Dilución mayor con la que se obtiene > 50% de protección.*	Interpolación del valor que corresponde a 50% de protección tomando los 2 puntos por encima y por debajo de éste**
1	3.0	4	4.5
2	6.1	2	2.9
3	23.3	32	42.9
4	19.1	16	19.4
5	3.7	4	3.2
6	10.4	16	17.7
7	23.3	32	28.0
8	13.3	16	14.5
9	1.4	1	1.6
10	2.6	4	4.3
Patrón	7.9	8	8.4

* equivalente a una lectura visual

** equivalente a otras formas de cálculo que aparecen en la literatura (Forti et al., 1986)

Tabla 4

Calibración de la preparación de IFN alfa leucocitario de referencia de laboratorio con respecto a la internacional Ga23-902-530 (título asignado 12 000 UI/mL). En días diferentes se titularon las dos preparaciones por triplicado en las mismas placas. El patrón internacional se utilizó diluido 1:24, de manera que su título en la placa fuese 500 UI/mL) Los datos son los promedios geométricos de las 3 determinaciones de cada día. De éstos valores de calculó el título corregido para cada día y después la media geométrica de todos los días, que es el título asignado a la referencia de laboratorio.

Fecha	Títulos obtenidos (UI/mL)		Referencia de laboratorio	
	Referencia de laboratorio	Referencia internacional	Título corregido	Logaritmo
18/12/89	660.2	464.5	710.7	2.852
21/12/89	759.9	970.1	391.7	2.593
23/12/89	415.4	1128.0	184.1	2.265
25/12/89	441.0	577.4	381.8	2.582
27/12/89	307.2	550.7	278.9	2.445
28/12/89	403.2	255.1	790.2	2.898
29/12/89	300.5	274.4	547.7	2.739
04/01/90	288.8	363.9	396.7	2.599
08/01/90	327.7	381.2	429.9	2.633
10/01/90	350.8	254.5	689.3	2.838
11/01/90	319.5	409.9	389.7	2.591
13/01/90	476.5	1092.9	218.0	2.338
18/01/90	923.9	657.0	703.1	2.847
19/01/90	216.1	383.8	281.6	2.450
20/02/90	208.5	259.3	402.0	2.604
22/01/90	465.4	571.0	407.6	2.610
23/01/90	360.7	493.4	365.5	2.563
25/01/90	424.0	540.5	392.3	2.594
26/01/90	619.2	846.4	365.8	2.563
28/01/90	231.2	237.3	487.3	2.688
media				2.615
desviación estándar				0.162
error estándar				0.037
intervalo de confianza (al 95%)				0.076
título correspondiente			411.7,	
límite inferior			345.8	
límite superior			490.1	

Tabla 5

Titulación de la actividad antiviral de 2 muestras de interferón leucocitario alfa semipurificado (PIF). Comparación entre los resultados obtenidos por tres métodos: SUMA-trasformación PROBIT, lectura visual de la tinción y hemaglutinación. Se tituló la misma muestra en las fechas señaladas, durante 16 días diferentes.

Fecha	SUMA		Lectura visual		Hemaglutinación	
	Título x10^5	log 10	Título x10^5	log 10	Título x105	log 10
Muestra PIF 2869 A						
3/8/92	14.4	1.158	16	1.204	32	1.505
6/8/92	21.8	6.338	22.3	6.348	32	6.505
12/8/92	13.2	6.120	11.3	6.053	16	6.204
14/8/92	16.7	6.222	16.0	6.204	16	6.204
19/8/92	16.0	6.204	16.0	6.204	16	6.204
21/8/92	11.3	6.053	8.0	5.903	8	5.903
27/8/92	26.5	6.423	22.3	6.348	32	6.505
31/8/92	18.1	6.257	16.0	6.204	16	6.204
2/9/92	8.7	5.939	22.3	6.348	32	6.505
3/9/92	18.2	6.260	16.0	6.204	16	6.204
9/9/92	10.3	6.012	16.0	6.204	32	6.505
10/9/92	16.9	6.227	16.0	6.204	16	6.204
14/9/92	15.6	6.193	16.0	6.204	16	6.204
16/9/92	15.8	6.198	16.0	6.204	8	5.903
17/9/92	11.9	6.075	11.3	6.053	8	5.903
30/9/92	21.1	6.324	16.0	6.204	16	6.204
media	15.4*	6.188	15.6*	6.192	17.5*	6.244
desviación estándar		0.122		0.114		0.216
error estándar		0.030		0.028		0.054
intervalo de confianza al 95%		0.065		0.060		0.115
Muestra PIF 2809 A						
8/1/92	26.3	6.419	22.3	6.348	16	6.204
9/1/92	23.9	6.378	32.0	6.505	16	6.204
10/1/92	30.6	6.485	32.0	6.505	32	6.505
13/1/92	20.8	6.318	22.3	6.348	32	6.505
16/1/92	21.9	6.340	22.3	6.348	32	6.505
17/1/92	22.5	6.352	32.0	6.505	32	6.505
20/1/92	13.1	6.117	11.3	6.053	16	6.204
22/1/92	10.6	6.025	11.3	6.053	32	6.505
27/1/92	23.9	6.378	32.0	6.505	16	6.204
29/1/92	10.0	6.000	16.0	6.204	16	6.204
30/1/92	16.8	6.225	11.3	6.053	8	5.903
31/1/92	19.0	6.278	16.0	6.204	16	6.204
3/2/92	27.1	6.432	32.0	6.505	32	6.505
5/2/92	15.8	6.198	16.0	6.204	16	6.204
10/2/92	20.9	6.320	16.0	6.204	16	6.204
17/2/92	19.1	6.281	22.3	6.348	16	6.204
media	19.3*	6.284	20.2*	6.305	19.9*	6.298
desviación estándar		0.135		0.165		0.175
error estándar		0.033		0.041		0.043
intervalo de confianza al 95%		0.072		0.088		0.093

* En el caso de los títulos la media es geométrica, obtenida del antilog de la media de los logaritmos

La tabla 3 muestra los títulos calculados en esa misma placa, de acuerdo con las lecturas fotométricas según el criterio visual simple (dilución menor que produjo 50% de protección a la monocapa celular), interpolación entre las diluciones inmediatamente por encima y por debajo del valor de 50% de protección y el valor correspondiente de la recta de regresión con la transformación PROBIT de las lecturas. Se observa que los títulos son esencialmente equivalentes.

Validación de los títulos obtenidos

En la tabla 4 se presentan los resultados de la calibración de la preparación de referencia de laboratorio con respecto a la internacional Ga23-902-530. Se observa que el título asignado se obtuvo con un intervalo de confianza de 0.076, que es altamente satisfactorio.

Para la validación de los resultados que ofrece el método, se compararon los títulos obtenidos para un panel de preparaciones de IFN alfa leucocitario semipurificado (PIF) revelados por hemaglutinación, lectura visual directa, y lectura y procesamiento en el equipo SUMA. La tabla 5 ofrece los resultados,; se demuestra que no hubo diferencias significativas entre los distintos métodos de revelado y procesamiento.

Por último, la figura 4 muestra los resultados de titular una muestra de control de IFN alfa leucocitario crudo, a ciegas, diariamente durante un periodo de tiempo prolongado (un año). La reproducibilidad de los resultados es buena, con un intervalo de confianza al 95% de ± 0.107 (en log), para los primeros 20 valores, lo cual es satisfactorio. En la figura 4 se observa que no hubo tendencia a desviación sistemática del promedio a lo largo del año, y que la dispersión se mantuvo también en el mismo nivel inicial, siendo muy pocos los valores que salieron del rango de la media ± 2DS.

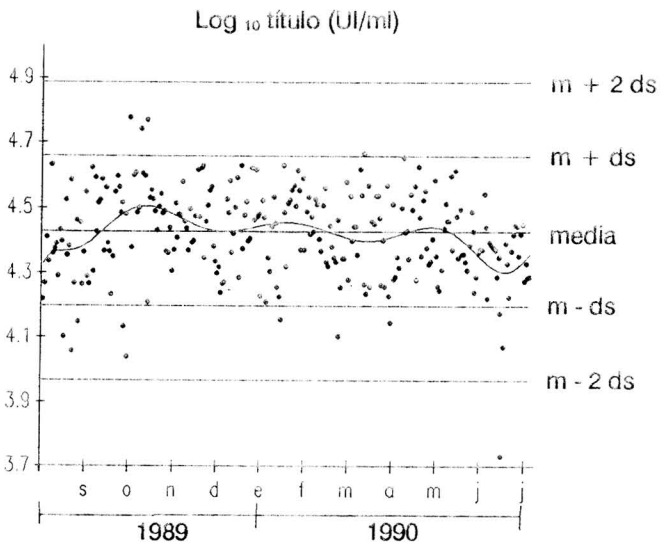

Fig. 4: Gráfico de control de reproducibilidad de una muestra a ciegas durante un año. Se tituló una misma muestra de IFN alfa leucocitario crudo colocada a ciegas entre las muestras de control de la producción de cada día. El resultado corresponde al periodo de un año entre el 1/8/89 y el 30/7/90. Las líneas horizontales indican el valor de la media geométrica y de ésta ± 1 y 2 desviaciones estándares de los valores de los primeros 20 días. La curva indica la tendencia en el tiempo del promedio de los títulos obtenidos (media corrida de 20 valores).

DISCUSION

La titulación de la actividad antiviral del IFN en muestras biológicas es un procedimiento laborioso que se ha ido simplificando con el desarrollo de métodos basados en el uso de microplacas de 96 pocillos y en la tinción de las células y ulterior lectura de los resultados. Esta lectura se realiza tradicionalmente en forma visual, por un experto. Como todas las placas incluyen una muestra de referencia, calibrada a su vez contra un patrón internacional, los valores se dan en unidades internacionales y son comparables entre sí las de todos los laboratorios. Sin embargo, el hecho de que la lectura sea visual implica siempre un componente subjetivo que adquiere mayor importancia en la medida en que es mayor el volumen de trabajo. Particularmente en el control de procesos de producción de IFN el número de muestras a titular cada día puede ser considerable, por lo que es deseable un procedimiento automatizado que obvie este elemento subjetivo y además aumente la eficiencia de lectura.

En la literatura existen procedimientos de lectura automatizada de placas de titulación, después de diluir el colorante (Forti *et al.*, 1986), lo que implica un paso más de manipulación. Además, estos autores calculan el título sólo basándose en los puntos de la placa que quedan inmediatamente por encima y por debajo del 50% de protección.

El método que se presenta en este trabajo ofrece la ventaja de la lectura automatizada y rápida

(menos de 3 min por placa, incluyendo los cálculos e impresión de los resultados), eliminándose el factor subjetivo de la lectura visual. En este sentido la lectura tiene las mismas limitaciones que la visual, siendo mayor el error cuando hay irregularidades en la monocapa celular (desprendimientos por toxicidad, contaminaciones, alteraciones del pH o errores de manipulación durante la dilución de las muestras).

La lectura de las placas secas es confiable, como lo demuestra la alta correlación con la lectura después de diluir. Aunque se pierde el 20% en sensibilidad, no se alteran los títulos, pues las muestras de referencia se modifican de la misma manera. Al eliminar un paso de manipulación se ahorra tiempo, además de los reactivos para la dilución, y se evita una fuente más de error. La repetibilidad de las lecturas entre las diferentes posiciones de la placa fue satisfactoria (coeficiente de variación = 10.4%) si se tiene en cuenta que en ese experimento se incluye la medición de los errores en el sembrado de las placas, incubación de cultivo, crecimiento celular, tinción y lectura. Como los controles de virus y células se colocan en la columna 12 de la placa, donde las lecturas son 10% menores que en las columnas del centro, se pudiera pensar que se introduce un error adicional en el cálculo de todos los títulos de la placa. Sin embargo, este error afecta tanto a los controles de virus como a los de células, y las demás lecturas de la placa se normalizan con respecto a la diferencia entre los dos controles, por lo que este error no debe ser importante.

La curva dosis-respuesta de protección por IFN de la monocapa celular frente al ECP del virus es sigmoidal, similar a las curvas de crecimiento de respuesta a diferentes dosis de factores de crecimiento, como por ejemplo, células CTLL frente a IL-2 (Gillis *et al.*, 1978). Este sistema fue tratado mediante la transformación PROBIT de las lecturas, con lo que se obtuvo la linealidad de la relación. En el caso de las titulaciones de IFN sucedió lo mismo, fue lineal la relación entre la transformación PROBIT de la lectura de absorbancia (medida de la cantidad de células presentes) y el logaritmo de la dilución. Esta transformación permite utilizar prácticamente todos los puntos de la placa, disminuyendo la probabilidad de error producto de un pozuelo con una lectura alterada, que puede afectar considerablemente a la evaluación visual, o a la interpolación a partir de solamente dos puntos.

Este procedimiento se viene utilizando en el control del proceso de producción de IFN desde hace varios años. Los resultados de muestras de control **a ciegas** y de paneles de muestras de actividad conocida durante períodos de tiempo prolongados son muy satisfactorios, por lo que es recomendable su uso como rutina en el control de procesos. No se ha empleado aún como control de producto final, pues para ésto se sigue prefiriendo el revelado por hemaglutinación, que mide directamente la producción de elementos virales.

REFERENCIAS

CANTELL, K.; S. HIRVONEN; H.H. KAUPPINEN and G. MYLLYLA (1981a). Production of Interferon in Human Leukocytes from Normal Donors with the use of Sendai Virus. In: Methods in Enzymology. Pestka, S. ed. Academic Press, New York, Vol. **78**:29-38.

CANTELL, K.; S. HIRVONEN and V. KOISTINEN (1981b). Partial Purification of Human Leukocyte Interferon on a Large Scale. In: Methods in Enzymology. Pestka, S. ed. Academic Press, New York, Vol. **78**:499-504.

FAMILLIETTI, P.C.; S. RUBINSTEIN and S. PESTKA (1981). Assays of interferon activity. In: Methods in Enzymology, Pestka,S. ed. Academic Press, N. York, Vol. **78**:387-396.

FINNEY, D.J. (1952). PROBIT analysis; a statistical treatment of the sigmoid response curve. 2da edición, Cambridge, at the University Press, pp. 255-263.

FINTER, N.B. (1969). Dye uptake methods for assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. J. Gen. Virol. 5:419-427.

FORTI, R.L.; S.S. SCHUFFMAN; H.A. DAVIES and W.M. MITCHELL (1986). Objective antiviral assay of the interferon by computer assisted data collection and analysis. In: Methods in Enzymology, Pestka, S. ed. Academic Press, New York, **119**:533-540.

GILLIS, S.; M.M. FERM; W. ON and K.A. SMITH (1978). T-cell growth factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. J.Immunol. **120**:2027-2032.

McMANUS, N.H. (1976). Microtiter assay for interferon: microspectrophotometric quantitation of cytopathic effect. Appl. Environm. Microbiol. **31**:35-38.

NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES, National Institutes of Health, NIH (1984). Freeze-dried Reference Human Interferon Alpha [HuIFN-α(Leukocyte/Sendai) Research Reference Reagent Note No.29, Bethesda, Maryland 20205, January 1984.