

ULTRAMICROELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM AL *MYCOBACTERIUM LEPRAE* UTILIZANDO MUESTRAS DE SANGRE SECA

Adriana TORRELLA (1), Rosa L. SOLIS (1), Nerys RODRIGUEZ (1), Yadira MEDINA (2), Martha PITA (2), Ivis PEREZ (2) & Nubia LICOURT (2)

RESUMEN

En este trabajo se establecen las condiciones óptimas para la detección de anticuerpos IgM al glicolípido fenólico-I (GF-I) en muestras de sangre en papel de filtro utilizando el UltramicroELISA HANSEN y la tecnología SUMA. Se estudiaron 300 donantes de sangre y 58 pacientes leprosos. Para estas dos poblaciones se compararon los resultados de muestras de sangre seca colectadas en papel de filtro SS-2992 con los de suero, y se obtuvo una correlación de 0.919 para donantes de sangre, 0.969 para pacientes y 0.954 para el total de las dos poblaciones. Se obtuvo una coincidencia de 98% en pacientes y 96% en donantes. En la población de pacientes la sensibilidad fue de 93% y la especificidad de 100% para las muestras de sangre seca evaluadas por el UMELISA HANSEN, con respecto a las muestras de suero analizadas por esta misma técnica.

UNTERMOS: Lepra; IgM anti-glicolípido fenólico-I (IgM ANTI GF-I) UltramicroELISA; Sangre seca en papel de filtro.

INTRODUCCION

El diagnóstico temprano y la intervención quimioterapéutica constituyen un prerequisite esencial para un decremento de las deformidades asociadas con la lepra^{1, 2, 7, 8}. Nosotros producimos un estuche de reactivos (ultramicroELISA HANSEN) para la detección de anticuerpos IgM *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), destinado fundamentalmente al diagnóstico de la lepra lepromatosa, pues es en este tipo de lepra donde se encuentran los niveles más altos de IgM, en correspondencia con la alta carga bacilar. Esta técnica además de presentar las ventajas propias del ELISA, como son, su alta sensibilidad y su capacidad de manejar gran número de muestras simultáneamente, tiene la ventaja de trabajar con volúmenes mínimos de muestras y reactivos (10 µl). En el UMELISA HANSEN,

se emplea como recubrimiento de las placas de reacción un disacárido sintético componente del glicolípido fenólico-I (GF-I), que como ya ha sido reportado^{4, 10}, produce una respuesta de anticuerpos IgM que es el indicador más sensible de la multiplicación bacteriana temprana, mucho antes de que la bacteria pueda ser detectada en la piel; de ahí la importancia de la detección de esta clase de anticuerpos de forma precoz.

En la actualidad, muchos ensayos que emplean muestras de suero han sido adaptados para muestras de sangre seca colectadas en papel de filtro, debido a las ventajas inherentes a esta variante. Nosotros establecimos los parámetros óptimos para la elución de las muestras de sangre seca en papel de filtro y su utilización en el UMELISA HANSEN, porque este método

(1) Centro de Inmunoensayo. Apart 6945. Ciudad Habana. CUBA.

(2) Hospital Especializado Dermatológico: G. Fdez. Hdez-Baquero Rincón, Habana, CUBA.

Dirección para correspondencia: Lic. Adriana Torrella. Centro de Inmunoensayo. Apart 6945. Calle 134 y Ave 25, Playa, Ciudad Habana, Cuba.

de colección de muestras simplifica el transporte y almacenamiento de las mismas (las muestras secas en papel de filtro son ligeras, ocupan espacios pequeños, no se derraman), se abarata el proceso, y disminuyen los riesgos de contaminación para el personal que las manipula^{6, 12, 15}. Estas ventajas adquieren una particular importancia en el caso de la lepra^{3, 5}, pues al facilitarse el transporte de las muestras desde zonas rurales (las zonas endémicas casi siempre son rurales), se evita la pérdida o mezcla de las muestras, y se garantiza la confiabilidad de los resultados.

En este artículo describimos los criterios seguidos para el establecimiento de los parámetros óptimos en la colección de muestras de sangre en papel de filtro. En las condiciones seleccionadas, comparamos los resultados de sangre seca con los de suero para el UMELISA HANSEN en una población sana y una población de pacientes, con el objetivo de analizar la factibilidad del uso de muestras de sangre seca o sueros indistintamente, para un mismo estuche de reactivos.

MATERIALES Y METODOS

Muestras estudiadas:

- Donantes de Banco de Sangre (300).
- *Pacientes con lepra lepromatosa, del Hospital Especializado Dermatológico:* Guillermo Fdez. Hdez. Baquero (58): 10 pacientes con baciloscopia positiva y tratamiento quimioterapéutico; 48 pacientes negativos (baciloscopia negativa) que terminaron el tratamiento quimioterapéutico y se encuentran en fase de observación.

Colección de muestras de sangre en papel de filtro

Se colectaron muestras de sangre del dedo de cada paciente o donante en círculos de un centímetro de diámetro en papel Schleicher & Schuell - 2992, teniendo en cuenta que la gota penetrara igualmente en ambas caras del papel. Después de secarlas a temperatura ambiente (20-25°C), se guardan en pequeñas bolsas de nylon bien selladas y se almacenan a 4°C hasta que son evaluadas. En el momento de efectuar el análisis de las mismas, se realiza un ponche de 6 mm diámetro del centro de la mancha.

Colección de muestras de suero

Se colectaron muestras de sangre venosa de cada paciente o donante, al que le fue tomada una muestra de sangre en papel de filtro. Estas fueron procesadas y llevadas a suero.

Establecimiento de las condiciones óptimas de elución de la sangre en papel de filtro

Para establecer la dilución óptima primeramente se midió el volumen de sangre absorbido por un disco de 6 mm de papel de filtro, mediante el método de pesadas. Este volumen fue de 10.3 µl equivalentes aproximadamente a 5.15 µl de suero. Se probaron múltiples variantes para determinar el tampón más adecuado, el volumen a utilizar del mismo, el tiempo y la temperatura de elución.

La población de pacientes, con casos positivos y negativos por baciloscopia, se evaluó en suero con sus muestras correspondientes en sangre seca, utilizando tres tampones diferentes en la elución: Tris-Tween (Tris-T) 15 mM con Tween al 1.25%, Tris-T conteniendo suero de camero al 5% y Solución Salina Tamponada con Fosfato (SSTF), pH 7.2. Estos tampones se probaron en diferentes volúmenes: 50, 100, 150 y 200 µl, buscando la dilución de las muestras de sangre en papel de filtro en la que se obtuvieran los resultados más similares a los obtenidos para la dilución 1/40 de las muestras de suero.

Paralelamente fueron evaluadas tres variantes para el tiempo y la temperatura de elución: 18 horas a 4°C, 1 hora a temperatura ambiente (20-25°C), y media hora a esta misma temperatura, para los diferentes tampones y volúmenes de elución.

Se seleccionaron como óptimos aquellos parámetros donde se obtuvo una mejor correlación y coincidencia, sin pérdida de la sensibilidad y la especificidad, para las muestras de pacientes, en suero y sangre en papel de filtro. Con las condiciones seleccionadas, se realizó la evaluación de una población supuestamente sana (población de 300 donantes de sangre) en suero y sangre en papel de filtro, para comprobar si los parámetros establecidos en la elución de muestras de sangre seca fueron los adecuados, y analizar así la factibilidad de usar muestras de sangre seca en papel de filtro para la detección de anticuerpos IgM, con El UMELISA HANSEN.

Umelisa Hansen

Es un ensayo heterogéneo inmunoenzimático de tipo indirecto en el cual se utiliza como fase sólida una placa de ultramicroELISA (10 µl por pocillo). Estas placas fueron recubiertas previamente con 2.5 µg/ml de un disacárido del glicolípido fenólico - I, unido a la suero albumina bovina (SAB), sintetizado y suminis-

trado por el Laboratorio de Química de los Carbohidratos de la Universidad de la Habana, Cuba, diluido en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6.

Las muestras de suero y los sueros controles positivo y negativo se diluyen 1:40 y se aplican 10 µl por duplicado en los pocillos de la placa de reacción, se incuban 30 min a 37°C, formándose el complejo antígeno-anticuerpo en el caso que las muestras sean positivas. Las muestras de sangre seca en papel de filtro se eluyen por duplicado en las condiciones seleccionadas y se transfieren 10 µl del sobrenadante de la elución a la placa de reacción, incubando en las mismas condiciones que las muestras de suero. Se añade entonces un conjugado formado por la fosfatasa alcalina y la fracción IgG purificada de un antisuero anti IgM humana, elaborado en el Centro de Inmunoensayo y diluido 1/10000, el cual se unirá a los anticuerpos fijados en la reacción anterior. La realización de lavados intermedios con Tris-T, elimina los componentes no fijados. Después de la incubación del conjugado, 30 min a 37°C, se añade un sustrato fluorogénico (4-metil umbeliferil fosfato), que será hidrolizado por la enzima del conjugado, y la intensidad de la fluorescencia emitida es leída en un lector automatizado SUMA, para detectar la presencia de anticuerpos IgM al *M. leprae*.

Los resultados se expresan como una relación de la fluorescencia de la muestra con respecto a la fluorescencia del suero control positivo. Se consideran positivas las muestras que exceden el valor del nivel de corte (0.3), el cual fue establecido por estudios poblacionales realizados para la normalización del UMELISA HANSEN en muestras de suero.

Equipos

Fue utilizado un lector automatizado SUMA, modelo 321, acoplado a una microcomputadora. Además se empleó una multipipeta de 96 posiciones computadorizada (ERIZO 101), así como otros accesorios específicos para el procesamiento de muestras y reactivos en el rango ultramicroanalítico. Estos equipos y accesorios, pertenecen a la tecnología SUMA, y son elaborados en el Centro de Inmunoensayo, Ciudad Habana, Cuba.

Análisis estadístico

Mediante el programa de computación STATGRAPHICS, se realizó un análisis de la distribución de frecuencias para la población de donantes de sangre, en suero y en muestras de sangre. Además, mediante este

mismo programa, se determinó el coeficiente de correlación entre los dos métodos de colección de muestra, para la población de donantes de sangre, la población de pacientes, y el total de la población.

La coincidencia entre los resultados de las muestras de sangre seca y las muestras de suero para el UMELISA HANSEN, se expresó como el número de sujetos en la población en estudio que fue positivo en suero y en sangre, más el número de sujetos que fue negativo en suero y en sangre, dividido entre el número total de muestras ¹⁶.

Estabilidad

Se almacenaron muestras positivas y negativas colectadas en papel de filtro a 4°C, -20°C, temperatura ambiente (20-25°C) y 37°C, y se analizó el porcentaje de recuperación de la relación fluorescencia de la muestra con respecto a la del control positivo al compararlas con los sueros correspondientes y con los resultados iniciales de estas muestras de sangre en papel de filtro, a diferentes intervalos de tiempo.

RESULTADOS

Se establecieron las condiciones óptimas para la elución de las muestras de sangre seca en papel de filtro. Las mismas se relacionan a continuación:

Tiempo de elución:	30 minutos
Temperatura de elución:	Temperatura ambiente (20-25°C)
Tampón de elución:	Tris-T ó Tris-T conteniendo suero de carnero al 5%.
Volumen de elución:	100 µl
Dilución de las muestras:	1/20

En estas condiciones se realizó el estudio de una población de donantes de sangre. Al analizar la distribución de frecuencias para esta población se observó un 4% de individuos seropositivos en suero, mientras que en muestras de sangre se encontró sólo un 0.7% de seropositividad (Fig. 1). En la Tabla 1 se muestran los resultados del UMELISA HANSEN en la población de donantes de sangre utilizando muestras de sangre seca y muestras de suero, con una especificidad de 100% para las muestras de sangre seca con respecto a las muestras de suero.

Para los parámetros de elución seleccionados, al comparar los resultados de la dilución de las muestras de sangre en papel de filtro (1/20) con los de su dilución

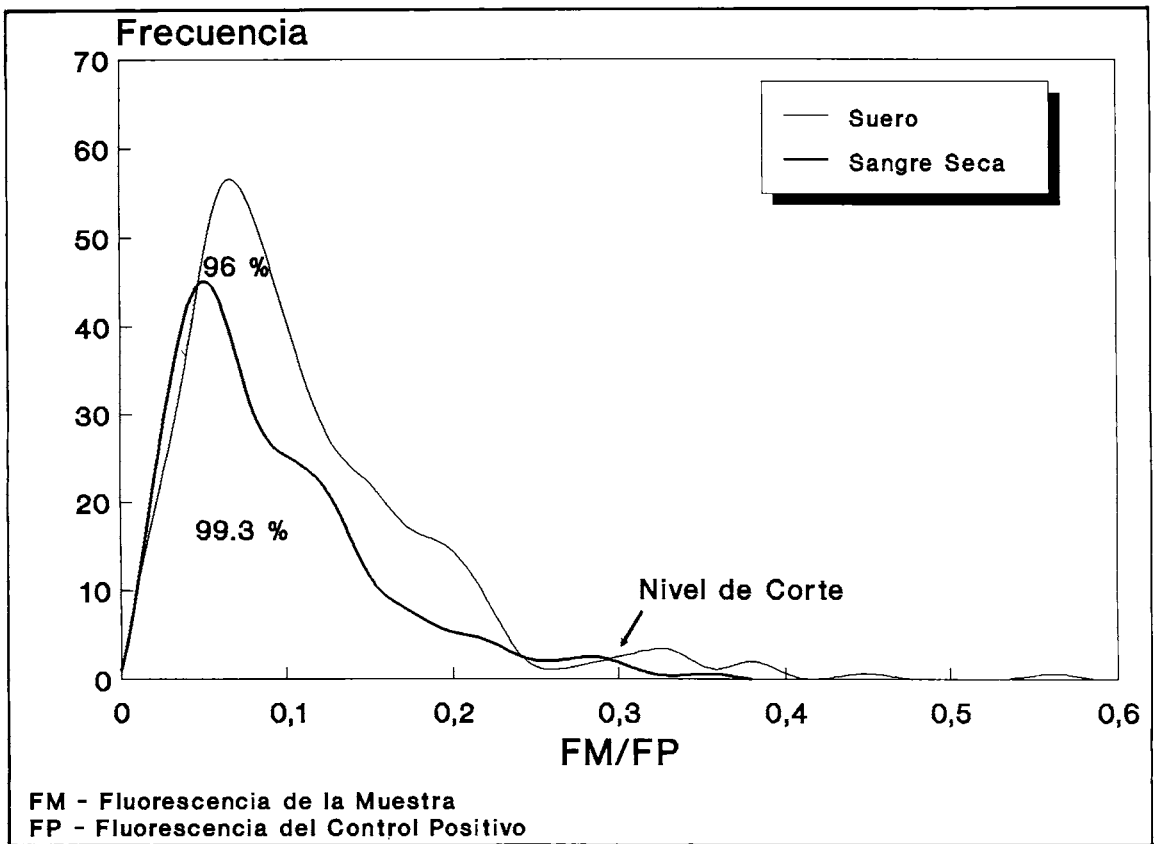


Fig. 1. Distribución de frecuencia de las lecturas por ultramicroELISA de anticuerpos IgM Anti-GF-I en una población sana.

TABLA 1

Comparación entre los resultados de las muestras de suero con las de sangre seca en una población de donantes de sangre

Sangre Seca \ Suero	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2	0	2
Negativo	10	288	298
Total	12	288	300

En la población de pacientes encontramos una sensibilidad de 93% y un 100% de especificidad para el UMELISA HANSEN con muestras de sangre seca al comparar los resultados con los obtenidos para las muestras de suero evaluadas por la misma técnica (Tabla 2). De 10 pacientes positivos por baciloscopia que están recibiendo tratamiento, 8 resultaron positivos por el UMELISA HANSEN en suero y en sangre, para un 80% de seropositividad.

TABLA 2

Comparación entre los resultados de las muestras de suero con las de sangre seca en una población de pacientes con lepra lepromatosa.

Sangre Seca \ Suero	Positivo	Negativo	Total
Positivo	13	0	13
Negativo	1*	44	45
Total	14	44	58

* Muestra Negativa en Baciloscopia

equivalente en suero (1/40), se obtuvieron los siguientes coeficientes de correlación:

Pacientes: 0.969 (Fig. 2)

Donantes de sangre: 0.919 (Fig. 3)

Total de Muestras: 0.954 (Fig. 4)

El porcentaje de coincidencia entre ambos métodos de colección de muestras fue 98% para la población de pacientes y 96% para la población de donantes.

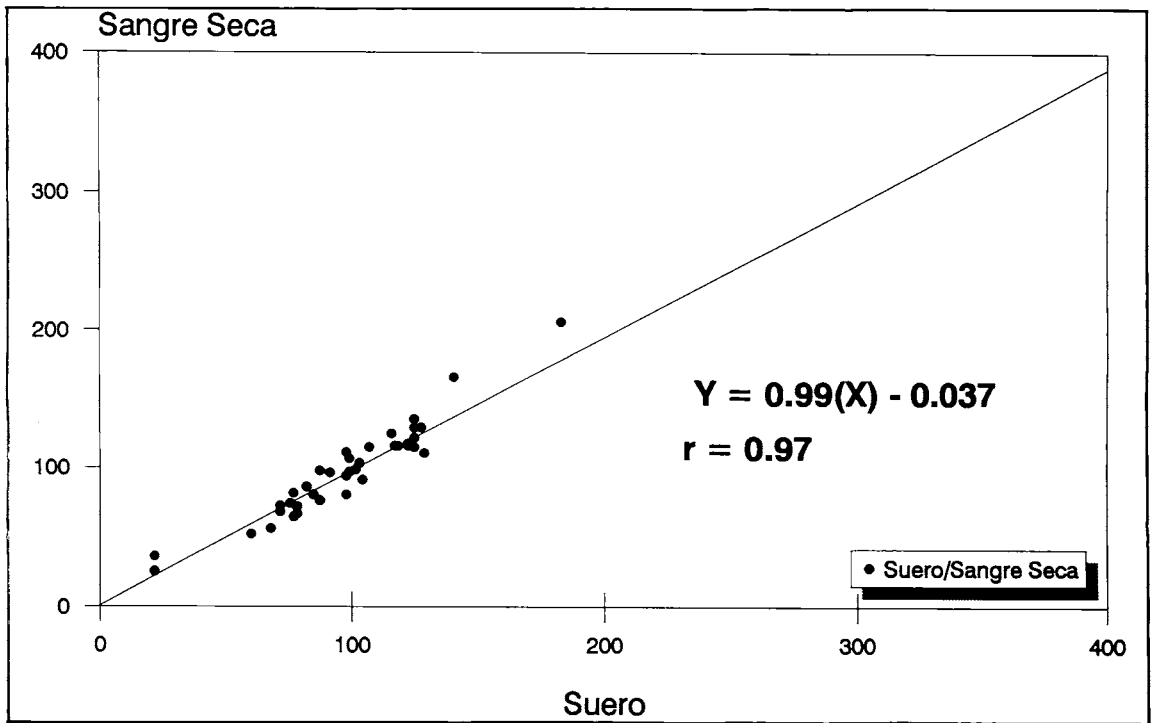


Fig. 2. Correlación entre los resultados de las muestras de suero y las de sangre seca para una población de pacientes con lepra lepromatosa.

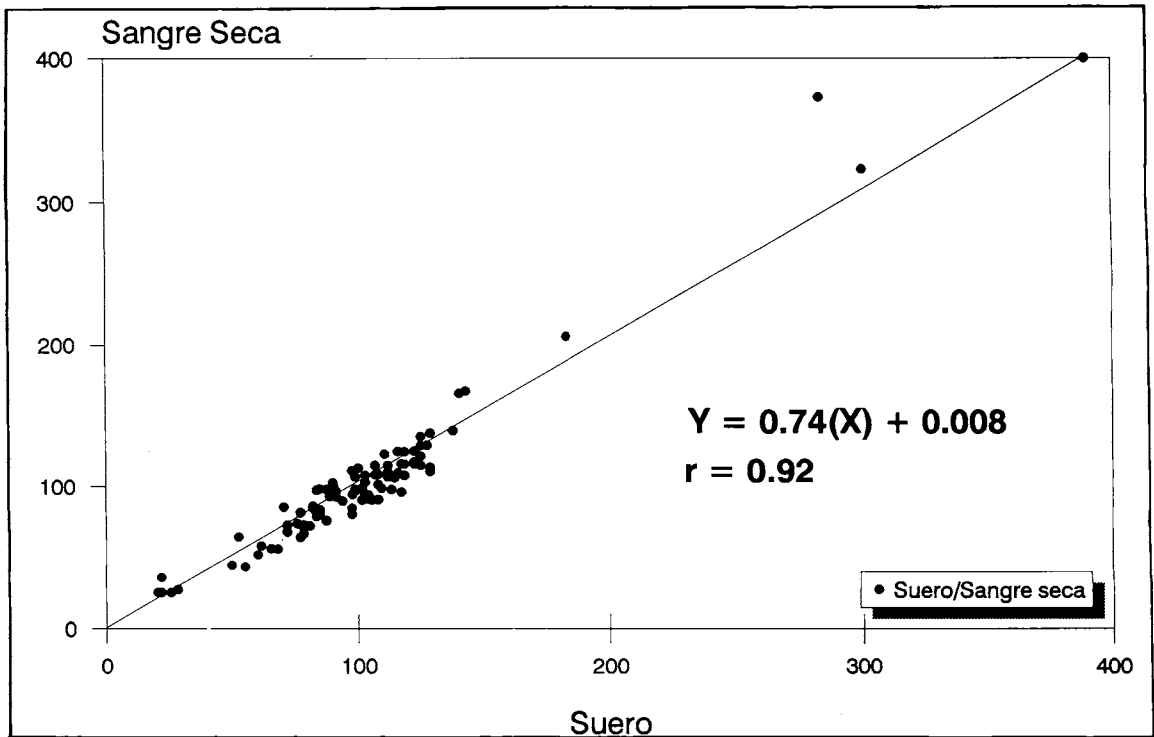


Fig. 3. Correlación entre los resultados de las muestras de suero y la de sangre seca para una población de donantes de sangre.

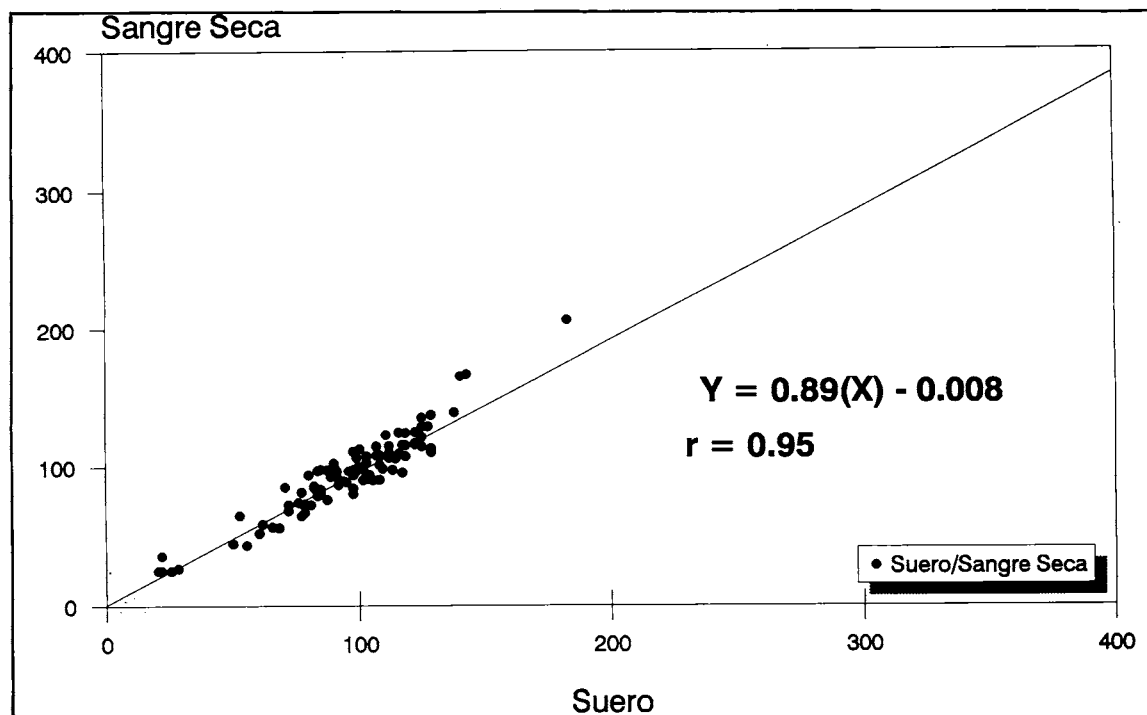


Fig. 4. Correlación entre los resultados de las muestras de suero y las de sangre seca para el total de muestras de ambas poblaciones: pacientes con lepra lepromatosa y donantes de sangre.

En los pacientes con baciloscopia negativa encontramos 5 casos con valores positivos para UMELISA HANSEN, que indican una posible recaída de la enfermedad.

En el análisis de estabilidad de las muestras colectadas en papel de filtro los resultados obtenidos hasta el momento nos muestran una recuperación de la seropositividad de 50% para 7 días a 37°C, 72% para 15 días a temperatura ambiente y la conservación de la actividad IgM en un 100% para 6 meses a -20°C y a 4°C. En ningún caso se observó variación apreciable en los valores de las muestras negativas.

DISCUSION

Ha sido reportada por otros autores⁵ la pérdida de sensibilidad en la detección de anticuerpos IgM al *M. leprae*, cuando se intenta analizar las muestras de sangre seca en la misma dilución que se analizan los sueros. Nuestros resultados confirman esta afirmación, pues los mejores coeficientes de correlación y los mayores porcentajes de coincidencia, sin pérdida de sensibilidad y especificidad se obtuvieron entre la dilución 1/20 de

muestras de sangre en papel de filtro y la dilución 1/40 de suero, lo que hace que las mismas sean consideradas equivalentes.

El 4% de seropositividad encontrado en muestras de suero no se corresponde con el esperado para esta población supuestamente sana, además este resultado se había reportado ya en estudios realizados con nuestro ensayo para esta misma población, y es poco probable la persistencia de este valor de seropositividad en el tiempo para una zona no endémica, por lo que pensamos que este 4% podría estar dado por los falsos positivos de la técnica en sueros. Así, el 0.7% de seropositividad observado en el ensayo con muestras de sangre en papel de filtro no es un indicio de pérdida de sensibilidad, sino que parece deberse a un aumento de la especificidad logrado con este método de elución de las muestras.

Los coeficientes de correlación y porcentajes de coincidencia entre los dos métodos de colección de muestras son más bajos en la población de donantes de sangre que en la población de pacientes. Esto pudiera estar relacionado con lo planteado anteriormente acerca de los problemas de especificidad del ensayo para

muestras de suero que se hacen más evidentes en una población sana.

La sensibilidad de 93% para muestras de sangre seca en la población de pacientes, está dada por una muestra que resultó positiva en suero y negativa en sangre en la evaluación por el UMELISA HANSEN. Esta muestra discordante pudiera ser un caso de infección subclínica (presencia de bacilos que aún no son detectables en piel y producen la elevación de la IgM en suero), pero si tenemos en cuenta que la muestra pertenece a un paciente que es considerado negativo por el examen clínico especializado y presenta baciloscopia negativa (Índice Bacilar=0), no se debe excluir la posibilidad de que éste sea un resultado falso positivo del UMELISA HANSEN en suero.

Consideramos que se obtuvo un buen porcentaje de seropositividad (80%) a IgM anti GF-I en pacientes tratados, teniendo en cuenta que con tratamiento disminuyen los bacilos con la consiguiente disminución de la respuesta IgM, hasta que ésta desaparece. El hecho de que 5 pacientes con baciloscopia negativa presentaron resultados positivos en el UMELISA HANSEN por ambos métodos de colección de las muestras, nos hace pensar en una reaparición de la respuesta IgM por una recaída de la enfermedad antes de que los bacilos sean detectados en piel, lo que ha sido reportado anteriormente por otros autores ^{11, 13}.

Los resultados de la prueba de estabilidad a 37°C y a temperatura ambiente se corresponden con lo reportado por otros autores, con relación a la inestabilidad de los anticuerpos IgM en papel de filtro ^{9, 14}. De acuerdo a esto, el transporte a temperatura ambiente no debe exceder los 15 días. El estudio de anaquel a 4°C y a -20°C solo llegó hasta 6 meses de almacenaje con buena recuperación, y en estos momentos se continúa realizando el mismo. Basándonos en los resultados obtenidos y en lo reportado en la literatura, recomendamos realizar el almacenaje de las muestras a 4°C hasta 6 meses y si es hasta un año almacenarlas a -20°C.

Por todo lo analizado podemos concluir que es factible el uso de muestras de suero o de sangre, indistintamente para un mismo estuche de reactivos, con lo cual cumplimos nuestro objetivo principal, al lograr la utilización de muestras de sangre seca en el UMELISA HANSEN para la detección precoz de la lepra lepromatosa.

SUMMARY

UltramicroELISA assay for the detection of IgM antibodies to *Mycobacterium leprae* using eluates of dried blood spots.

In this work the adequate conditions for the detection of IgM antibodies to PGL-I in eluates from dried blood spots using the UMELISA HANSEN and the SUMA technology are established. A total of 300 blood donors and 58 leprosy patients samples were studied. For both populations, in the previously established conditions, we compared the results of the eluates from dried blood spots with the serum samples, and was obtained a correlation of 0.919 in blood donors, 0.969 in patients, and 0.954 for the total of both populations. It was also obtained a level of agreement of 98% in patients and 96% in blood donors. In the patients population was found a sensitivity of 93% and a specificity of 100% for the eluates of dried blood spots evaluated by the UMELISA HANSEN in the comparison with the serum samples analyzed by the same assay.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. BAUMGART, K.; BRITTON, W.; BASTEN, A. & BAGSHAW, A. - Use of phenolic glycolipid for serodiagnosis of leprosy in a high prevalence village in Papua, New Guinea. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **81**: 1030, 1987.
2. BUCHANAN, T. M.; YOUNG, D. B.; MILLER, R. A. & KHANOLKAR, S. R. - Serodiagnosis of infection with *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Leprosy*, **51**: 524, 1983.
3. CASSOL, S.; SALAS, T.; ARELLA, M. & NEUMANN, P. - Use of dried blood spots specimens in the detection of human immunodeficiency virus type 1 by the polymerase chain reaction. *J. clin. Microbiol.*, **29**: 667-671, 1991.
4. CHUJOR, S. N.; BERNHEIMER, H.; LEVIS, R. W. & SCHWERER, B. - Serum IgA and IgM antibodies against *Mycobacterium leprae* derived PGL-I: a comparative study in leprosy patients and their contacts. *Int. J. Leprosy*, **59**: 441-449, 1991.
5. DHANDAYUTHAPANI, S.; ANANDAN, D.; VASANTHI, B. & BHATIA, V. N. - Use of eluates of filter paper blood spots in ELISA for the serodiagnosis of leprosy. *Indian J. med. Res.*, **89**: 150, 1989.
6. DHANDAYUTHAPANI, S.; ANANDAN, D. & BHATIA, V. N. - ELISA & lepromin skin tests in household contacts of leprosy patients. *Indian J. med. Res.*, **91**: 431-436, 1990.
7. DISSANAYAKE, S.; YOUNG, D. B.; KHANOLKAR, S. R.; MILLER, R. A. & BUCHANAN, T. M. - Evaluation of the significance of antibodies to phenolic glycolipid of *M. leprae* in leprosy patients and their contacts. *Int. J. Leprosy*, **52** (Suppl. 4): 691, 1984.
8. GONZALEZ, A. B.; GLEZ-ABREU, E. & VALDEZ-PORTELA, A.

- Leprosy: a brief account on the subject. *Rev. Med. trop. (Cuba)*, 40: 67-81, 1988.
9. GUIMARÃES, M. C. S.; CASTILHO, E. A. & CELESTE, B. J. - Long-term storage of IgG and IgM on filter paper for use in parasitic disease seroepidemiology surveys. *Bull. Pan Amer. Hlth. Org.*, 19: 16-28, 1985.
10. HUSSAIN, R.; JAMIL, S. & KIFAYET, A. - Quantitation of IgM antibodies to the *M. leprae* synthetic disaccharide can predict early bacterial multiplication in leprosy. *Int. J. Leprosy*, 58: 491-502, 1990.
11. MEEKER, C. H.; SCHULLER-LEVIS, G. & FUSCO, F. - Sequential monitoring of leprosy patients with serum antibody levels to PGL-I, a synthetic analog of PGL-I, and Mycobacterial lipoarabinomannan. *Int. J. Leprosy*, 58: 503-511, 1990.
12. MOUNT, L. D. & CHURCHILL, C. F. - Determination of mefloquine in blood, filter paper adsorbed blood and urine by 9 fluorenylmethyl chloroformate derivatization followed by liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.*, 564: 181-193, 1991.
13. MOUDGIL, K. D.; MISHRA R. & TALWAR, G. P. - Comparative evaluation of enzyme immunoassays based on synthetic glyco-conjugates and PGL-I for immunodiagnosis of leprosy. *Indian J. Leprosy*, 62: 60-65, 1990.
14. SHRIPAD, A. P.; GOPAL, R. M. D. & SINHA, S. - Screening of anti-*M. leprae* antibodies in the blood samples eluted from filter paper blood blots. *Int. J. Leprosy*, 58: 123-126, 1990.
15. VARNIER, O. E.; LILLO, F. B.; REINA, S. & TERRAGNA, A. - Whole blood collection on filter paper is an effective means of obtaining samples for human immunodeficiency virus antibody assay. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 4: 131-136, 1988.
16. ZICKER, F.; SMITH, P. G.; LUQUETTI, A. O. & OLIVEIRA, O. S. - Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter paper. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 68: 465-471, 1990.

Recebido para publicação em 01/07/1993.

Aceito para publicação em 09/11/1993.