

## UTILIDAD DE SANGRE ALMACENADA EN PAPEL DE FILTRO PARA ESTUDIOS SEROLOGICOS POR ELISA DE INHIBICION.

S. VÁZQUEZ, R. FERNÁNDEZ & C. LLORENTE.

---

### RESUMEN

Para evaluar la utilidad del método de recolección de muestras de sangre en papel de filtro para la detección de anticuerpos anti-dengue mediante un ELISA de Inhibición recientemente desarrollado en nuestro laboratorio, se realizó una toma simultánea de muestras de sangre en papel de filtro y de suero, de donantes de Banco de Sangre. Ambas muestras fueron conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y probadas a los 15 días, 3 y 6 meses respectivamente. A las muestras que resultaron positivas se les amplió el rango de dilución para determinar título. Al realizar la comparación entre ambas muestras, sangre en papel de filtro y suero, encontramos que no existían diferencias de detección significativas, tanto para los casos positivos como los negativos. No obstante se observó en ambas muestras y de forma general una disminución del título de anticuerpos (una dilución) al transcurrir el tiempo máximo establecido en nuestro estudio (6 meses).

**UNITERMOS:** Papel de Filtro; ELISA de Inhibición.

---

### INTRODUCCION

La toma de muestras de sangre total en papel de filtro ha sido utilizada con éxito para estudios serológicos en virología<sup>2,9</sup> y en parasitología<sup>6,8</sup>.

Esta forma de recolección es adecuada para pesquisajes masivos y otros estudios seroepidemiológicos, por las ventajas que reporta el método entre las que podemos señalar la facilidad para la toma de muestra, especialmente a niños pequeños y otras personas en las cuales resulta difícil obtener sangre venosa; las muestras son fáciles de transportar, de almacenar y ocupan poco espacio, no existiendo la posibilidad de roturas y derrames.

Una de las desventajas que se ha señalado a este sistema es la dificultad de estimar cual es la dilución del eluato obtenido de las muestras almacenadas en papel de filtro equivalente a la dilución de trabajo del suero, además del deterioro que sufren las inmunoglobulinas almacenadas por largo tiempo en papel de filtro. Sin embargo, a pesar de estas limita-

ciones se considera que este método presenta grandes ventajas con respecto a otros para fines seroepidemiológicos.

El presente estudio persigue investigar la utilidad de este método de recolección de muestras para la detección de anticuerpos anti-dengue mediante un ELISA de Inhibición recientemente desarrollado en el laboratorio.

### MATERIALES Y METODOS

**Muestras:** Se recolectaron muestras de sangre total en papel de filtro (Blood sampling paper Nobuto's tipo 1) y muestras de suero a un grupo de 135 donantes de sangre seleccionadas opinativamente en el Banco de Sangre del Hospital "Hermanos Ameijeiras", de la Ciudad de la Habana. Por cada donante se tomaron 3 papeles de filtro, los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron guardados en sobres de nylon a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los sueros fueron

separados en 3 alícuotas, conservándose a igual temperatura hasta su utilización. El día anterior a la realización del ELISA los papeles de filtro a utilizar fueron puestos en elución con buffer fosfato salina (PBS) pH 7,4 (0,4 ml por muestra correspondiente a una dilución de 1/10) y dejados durante toda la noche a 4°C. Los sueros fueron utilizados también a la misma dilución.

**Procesamiento de las muestras:** El estudio se realizó en 3 cortes para comparar los resultados en dependencia de la conservación de las muestras en diferentes períodos. Acorde con esto el 1er corte se realizó a los 15 días, el 2do a los 3 meses y el 3ro a los 6 meses de colectada la muestra.

**ELISA:** Se utilizó un método de ELISA de Inhibición recientemente desarrollado en el Departamento de Virología del IPK<sup>7</sup>, el cual se describe de manera resumida:

Se fijaron a la placa de poliestireno (M 29 AR, Dynatech) Igs humanas anti-dengue a una concentración de 1 µg/ml en buffer carbonato-bicarbonato; al siguiente día se realizó un bloqueo con Albumina Sérica Bovina (ASB) al 1% y seguidamente se añadió el antígeno del virus dengue 2 diluido 1/40 en PBS-T<sub>20</sub>, el cual se preparó a partir de una suspensión de cerebro de ratón lactante infectado con el virus. Posteriormente se adicionaron los sueros y eluatos correspondientes para una dilución de 1/10 en PBS, después se agregó el conjugado peroxidasa-Ig humanas anti-dengue obtenido en el laboratorio por el método del peryodato y trabajado a una dilución de 1/1500 en PBS-T<sub>20</sub>-Suero de ternera al 10%, por último el sustrato compuesto por 10 mg de Ortofenilendiamina, 10 µl de peróxido y 25 ml de buffer fosfato-citrato, deteniéndose la reacción a los 30 minutos con ácido sulfúrico al 2,5%. La lectura se realizó en un lector MicroElisa (Multiskan, Flow). Se calcularon los % de inhibición para cada muestra, considerando positivas aquellas que presentaran valores mayores o iguales al 50% de Inhibición. Estas fueron tituladas posteriormente para poder efectuar las comparaciones de título de anticuerpos entre los métodos de recolección y en los diferentes cortes durante el estudio.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos para el total de sueros y sangre en papel de filtro de los 135 donantes se muestran en la tabla 1, donde se puede observar una alta coincidencia (99,2 - 98,5 %) de resultados posi-

tivos y negativos por ambos métodos tanto a los 15 días como a los 3 y 6 meses, solamente 1 caso a los 15 días y 2 casos a los 3 y 6 meses no pudieron ser detectados como positivos en el suero y si en el papel de filtro. Estas muestras no coincidentes pudieran ser debido a falsos positivos por el papel de filtro o falsos negativos por el suero ya que se encontraban muy cercanos los % al criterio establecido por ELISA (mayor o igual al 50%). Cuando se analizaron los títulos de anticuerpos obtenidos por ambos métodos (tabla 2), se encontró que no había diferencias significativas entre los resultados a los 15 días y 3 meses para una  $p > 0,05$ , sin embargo a los 6 meses si se encontró diferencia significativa ( $p < 0,05$ ). Al calcular la media geométrica de los títulos para ambos métodos tanto a los 15 días como a los 3 meses fue de 40, no siendo así a los 6 meses la cual fue de 20, lo que demuestra una disminución del título de anticuerpos en al menos una dilución.

## DISCUSION

En un trabajo realizado para la normalización del uso del papel de filtro en la serología de dengue<sup>4</sup> mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación no se encontró diferencia significativa entre los dos tipos de muestras. En nuestro estudio encontramos resultados similares al obtener una alta coincidencia entre ambos métodos.

En un estudio realizado<sup>3</sup> con muestras en papel de filtro para la detección de anticuerpos anti-Toxoplasma y utilizando otras pruebas inmunológicas se encontró que la concentración de IgG no sufría variaciones en un período de 3 meses. En otro estudio realizado con papel de filtro para la detección de anticuerpos anti VIH mediante la técnica de ELISA<sup>5</sup> se encontraron valores más bajos de densidad óptica a los 3 meses de almacenamiento (4°C) con relación a los inicialmente obtenidos, lo cual pudiera haber estado determinado por la temperatura de conservación. Por otra parte<sup>1</sup> en un trabajo realizado en la detección de anticuerpos contra el virus Aujeszky se demostró que la actividad de anticuerpo puede ser detectada en papel de filtro por 1 año y almacenados a 4°C.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que pueden utilizarse muestras de sangre en papel de filtro para la detección de anticuerpos anti-dengue mediante el ELISA de Inhibición, encontrándose equivalencia entre ambos métodos de recolección cuando fueron analizados los resultados como número de positivos y negativos, así como con respecto a los títulos de anticuerpos obtenidos. Las

**TABLA 1**  
Resultados obtenidos en los diferentes tiempos de almacenamiento.

		Sueros*					
		15 días		3 meses		6 meses	
		+	-	+	-	+	-
Papel*	+	108	1	106	2	97	2
Filtro	-	0	26	0	27	0	36
% Coincidencia		99,2		98,5		98,5	

\* dilución inicial 1/10.

**TABLA 2**  
Títulos obtenidos en los dos tipos de muestra a los diferentes tiempos.

Título	15 días		3 meses		6 meses	
	PF*	S**	PF	S	PF	S
< 10	26	27	27	29	36	38
10	8	7	10	8	22	33
20	28	31	30	29	31	23
40	27	22	26	24	20	17
80	18	21	18	21	12	9
160	16	15	13	15	9	10
320	10	10	9	7	3	3
640	1	1	2	1	2	2
1280	1	1	0	1	0	0

\* Papel de filtro.

\*\* Suero.

muestras pueden ser conservadas 3 meses sin afectación de los títulos y hasta 6 meses con una posible disminución en el título de un 50% (una dilución) en ambos métodos de recolección.

La utilidad que reporta la toma de muestra de sangre en papel de filtro y la aplicación de una técnica con facilidad y rapidez de ejecución hacen que se combinen dos aspectos de importancia para estudios serológicos en virología.

### SUMMARY

#### Use of filter paper strips on an ELISA Inhibition Test for serologic studies on dengue.

To evaluate the usefulness of the collecting method of blood samples in filter paper strips for anti-dengue antibody detection using an ELISA Inhibition test which has been recently developed in our laboratory, blood samples collected on filter paper strips and serum samples were obtained from the

same blood donors.

Both samples were kept at -20°C and tested at 15 days, 3 and 6 months. Titers were determined in positive samples. Comparing the results, no significant differences were found between serum samples and blood samples collected in filter paper strips in relation to the number of negative and positive cases. Nevertheless, it was observed in both types of samples a decrease of the antibody titers (one dilution) in the longest period of our study (6 months).

### REFERENCIAS

1. BANKS, M. - Detection of antibodies to Aujeszky disease virus in whole blood by ELISA disc. *J. virol. Meth.*, 12: 41, 1985.
2. FARZADEGAN, H.; QUINN, T. & POLK, B.F. - Detecting antibodies to Human Immunodeficiency Virus in dried blood on paper filter. *J. infect. Dis.*, 155: 1073-1074, 1987.
3. GUIMARÃES, M.C.S.; CASTILHO, E.A.; CELESTE, B.J.; NAKAHARA, O.S. & AMATO NETO, V. - Almacenamiento a largo plazo de IgG e IgM en papel de filtro para su uso en encuestas seroepidemiológicas de enfermedades parasitarias. *Bol. Ofic. sanit. panamer.*, 100: 129-144, 1986.
4. GUZMAN, M.G.; KOURI, G. & BRAVO, J.R. - Normalización de la toma de muestra de sangre en papel de filtro para la serología del dengue. *Rev. cuba. Med. trop.*, 34: 114-118, 1982.
5. LINDHARDT B.O.; BUGBJERG, I.C.; ULRICH, K.; PETERSEN, H.D.; LAURSEN, I. & FREDERIKSEN, B. - Detection of antibodies to human immunodeficiency virus (HIV) in eluates from whole blood impregnated filter paper discs. *J. virol. Meth.*, 18: 73-77, 1987.
6. MARINKELLE, C.J.; De SANCHEZ, N.; GROGL, M. & GUHL, F. - Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales para el diagnóstico de infección chagásica con prueba de inmunofluorescencia. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 20: 112-114, 1978.
7. VÁZQUEZ, S. & FERNÁNDEZ, R. - Utilización de un ELISA de Inhibición para estudios serológicos en dengue. Reporte Preliminar. *Rev. cuba. Med. trop.*, 41: 18-26, 1989.
8. WALTON, B.C. & ARJONA, I. - Utilization of Whole blood specimens on filter paper for the indirect fluorescent antibody test for Toxoplasmosis. *J. Parasit.*, 57: 678-679, 1971.
9. WASSILAK, S.G.F.; BERNIER, R.H.; HERMANN, K.L.; ORESTEIN, W.A.; BART, K.J. & AMLER, R. - Measles seroconfirmation using dried blood specimens in filter paper. *Pediat. infect. Dis.*, 3: 117-21, 1984.

Recebido para publicação em 16/05/1990  
Aceito para publicação em 04/06/1991