

IgG antibodies to dengue in dry blood samples in filter paper.

Carmen Acosta, Regla Herrera,* Pedro Almenarez, Susana Vázquez***.**

Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales. Centro de Inmunoensayo. Apdo 6653.
Calle 134 y Ave 25, Playa, Ciudad Habana, CUBA.

* Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Centro de Inmunoensayo.

** Laboratorio de SIDA. Centro de Inmunoensayo.

*** Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". CUBA.

Recibido: 12 de junio de 2000

Aceptado: 22 de julio del 2002

Palabras claves: Dengue; UltramicroELISA; Sangre total en papel de filtro.

Key Words: Dengue, UltramicroELISA, Dry blood samples in filter paper.

RESUMEN: En este trabajo se presentan los resultados de la normalización del procedimiento de detección de anticuerpos IgG contra el virus dengue en muestras de sangre colectadas sobre papel de filtro. Las muestras se obtuvieron de 216 individuos que acudieron al banco de sangre de Marianao de los cuales 25 presentaron resultados con títulos superiores a 1:40 por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación. En todas las muestras se determinó la presencia de anticuerpos IgG contra el virus dengue mediante un inmunoensayo enzimático (UMELISA) de captura. Cuando se compararon las condiciones de elución de treinta minutos y una hora la coincidencia fue del 93 y 100 % respectivamente. En las dos condiciones evaluadas en el paso de la incubación de las muestras en la placa de reacción; una hora a 37 °C y una hora a temperatura ambiente; la coincidencia fue del 100 %, manteniendo este paso igual para el procesamiento de muestras de sangre colectadas sobre papel de filtro como las de suero (una hora a 37 °C). Al analizarse en su conjunto los resultados de las muestras se obtuvo una sensibilidad y especificidad del 100 % en los tiempos ensayados, para la prueba efectuada con sangre total colectada sobre papel de filtro conservada a 4 °C y las conservadas a temperatura ambiente. Los autores recomiendan la utilización de este método para la detección de anticuerpos anti dengue.

ABSTRACT: This paper presents a standardized procedure for the detection of IgG antibodies to dengue virus in blood samples taken from filter paper. The samples were obtained from 216 blood donor persons, 25 of them had IH titer superior of 1:40. All the samples were tested for IgG antibody against dengue virus by means of capture enzyme immunoassay (UMELISA). In a comparison of the results when the elution was performed 30 min. and 1 hour the agreement between the results of the test and those of the UMELISA using serum samples were 93 y 100 % respectively. In both conditions the incubation of the samples in the reaction plate, were 1 hour at 37 °C and 1 hour room temperature, the agreement were 100 %, the same method was employed with the serum samples (one hour a 37 °C). When we analyzed all samples the result of the sensitivity and specificity were 100 % when the samples were collected in whole blood on filter paper stored at room temperature and when it was stored a 4 °C, for one month and 4 months respectively. The authors recommend the use

of this method in the dengue IgG antibody determination is recommended.

INTRODUCCIÓN

La reaparición del Dengue en las Américas en sus formas más graves constituye un problema de salud en la región.¹ En la pasada década se observó un incremento del número de epidemias en los países afectados por esa enfermedad.^{2,3} Tal y como sucedió en los países del sudeste asiático, las formas graves se están haciendo endémicas.⁴

Desde la aparición de los primeros ensayos inmunoenzimáticos, se inició la evaluación del papel de filtro como método sencillo, económico y rápido para el análisis de muestras de sangre total.^{5,6}

Este método de colección de muestras es ampliamente utilizado para la realización de las pesquisas neonatales de diferentes enfermedades, por las ventajas que presentan en cuanto a las facilidades para obtener las muestras en niños pequeños y personas en las que resulta difícil la extracción de sangre venosa, así como por su fácil transporte y almacenamiento y la posibilidad de recolectar las muestras en zonas rurales. La utilidad de este método de colección de muestras para el diagnóstico del dengue ya ha sido demostrada por diferentes autores tanto para la

detección de anticuerpos totales con las técnicas de inhibición de la Hemaglutinación y ELISA como para la determinación de anticuerpos IgG.^{7,8}

Con el objetivo de facilitar la realización de la prueba, simplificar el proceso de colección de muestras, transporte, almacenaje y disminuir los riesgos de contaminación del operador, evaluamos el UMELISA Dengue IgG; utilizando muestras de sangre seca sobre papel de filtro, además, de las tradicionales muestras de suero. Además, se determinaron los parámetros óptimos para la elución y la evaluación de las muestras de sangre colectadas sobre papel de filtro en el UMELISA Dengue IgG.

MATERIALES Y METODOS

Muestras estudiadas

Se estudiaron muestras de suero y sangre total seca sobre papel de filtro de 216 donantes de sangre, escogidas al azar en el Banco de Sangre de Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.

Colección de las muestras

Las muestras se obtuvieron por punción venosa en los donantes. Esta sangre fue procesada hasta obtener el suero y los mismos fueron almacenados a -20°C hasta el momento de la evaluación.

Colección de las muestras de sangre seca en papel de filtro

De los donantes con una extracción útil de suero se les realizó una toma de sangre por punción digital y se aplicaron cuatro gotas de sangre sobre el papel de filtro Schleicher & Schuell-2992. Cada gota de sangre ocupó un área con diámetro de 10 mm^2 de. Los papeles de filtro se dejaron secar a temperatura ambiente durante un tiempo mínimo de 2 h, se sellaron individualmente en bolsas de nylon y se almacenaron a 4°C y a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización en la prueba de estabilidad. En el momento de la evaluación, se realizó un ponche sobre la mancha de sangre en forma de disco de 5 mm de diámetro con un ponchador auxiliar suministrado por la tecnología SUMA.

Preparación de las soluciones de trabajo del UMELISA Dengue IgG (Suero)

Sueros Controles: Se presentan en el estuche listos para el uso, diluidos 1:21 con suero de carnero al 20 % en Tris Tween 0,0157 M pH 7,8 para una concentración final de 5%. Este es el mismo diluyente que se empleó para la dilución de las muestras y la reconstitución del antígeno.

Muestras: Se diluyeron 1:21.

Antígeno: Se reconstituyó con 2 mL, para que las UH finales, fueran 16 UH.

Conjugado: Se presentó listo para el uso, diluido 1:3500 con Tris pH 8 y seroalbúmina bovina al 1%.

Sustrato: Se diluyó 1:10 antes de su uso.

Equipamiento

Se utilizaron equipos de la tecnología SUMA (Centro de Inmunoensayo, Ciudad de la Habana, Cuba)⁹.

Fluorímetro SUMA 421: Es un fluorímetro automatizado de alta sensibilidad, el cual realiza las lecturas de fluorescencia entre los 420 a 540 nm de longitud de onda. Se puede emplear también el SUMA 321 o el fotómetro - fluorímetro PR-521.

Lavador MAS 301: Es un equipo automatizado que garantiza la uniformidad de los lavados en las placas de reacción.

UMELISA DENGUE IgG: Es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo que tiene como principio la captura de anticuerpos IgG. Este, constituye una modificación de la técnica de ultramicroELISA ya normalizada donde en lugar de emplear anticuerpos anti IgM humana se emplean anticuerpos anti IgG humana.¹⁰

Se aplicaron $10\text{ }\mu\text{L}$ de suero humano diluido y los controles en los pocillos de la placa y se incubó 1 h a 37°C en cámara húmeda. Los anticuerpos IgG presentes en las muestras se fijaron a los anticuerpos del recubrimiento. Después de 6 ciclos de lavado (de 30 segundos cada uno) con tampón Tris-HCl 15 mM conteniendo Tween-20 al 0,05 %; se añadieron $10\text{ }\mu\text{L}$ de la mezcla de los 4 antígenos y se incubó 1 h a 37°C . Se realizó otro proceso de

lavado como ya se describió anteriormente y se añadieron $10\text{ }\mu\text{L}$ del conjugado en cada pocillo. En caso de reacción positiva el anticuerpo del conjugado se unió al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Las placas se incubaron como en la etapa previa y se lavaron nuevamente; posteriormente se adicionaron $10\text{ }\mu\text{L}$ de sustrato y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El sustrato fluorogénico fue hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitió detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos a los 4 serotipos del virus dengue. La lectura, validación e interpretación de los resultados se realizó de forma automática por el lector SUMA y su paquete de programas UMELISA Dengue IgG.

Condiciones de elución de la sangre seca colectada sobre papel de filtro

Los ponches de 5 mm fueron eluidos con $70\text{ }\mu\text{L}$ de suero de carnero al 5 % en Tris-Cl 15 mM (Diluyente de las muestras en el UMELISA Dengue IgG Suero).

Para la evaluación del tiempo de elución de los ponches se probaron dos variantes, la primera de 30 minutos a temperatura ambiente y la segunda de una h a esta temperatura. Para la selección de la variante óptima se tuvo en cuenta los porcentajes de correlación y coincidencia entre los resultados obtenidos con las muestras de suero y las de sangre seca sobre papel de filtro. Una vez establecida la condición adecuada con un número pequeño de muestras (20 muestras negativas y 20 positivas), se evaluaron las restantes.

Evaluación de la temperatura de incubación de las muestras de sangre seca eluidas del papel de filtro

Se evaluaron 25 muestras de sangre seca sobre papel de filtro con sus correspondientes sueros en el UMELISA Dengue IgG. Las muestras se incubaron una h a 37°C y una h a temperatura ambiente respectivamente en las placas de reacción. Como criterios para el establecimiento de la condición óptima de incubación de las muestras se tomaron la correlación y la coinci-

dencia de los resultados de las muestras de sangre seca sobre papel de filtro y sus sueros correspondientes.

Análisis Estadístico

Se empleó el programa estadístico Statgraphics, para realizar la distribución de frecuencia de la IgG Anti-Dengue en la población de donantes de sangre en suero y en muestras de sangre seca sobre papel de filtro. Empleando el mismo programa se determinó el coeficiente de correlación y la coincidencia se calculó como el número de muestras positivas en suero y en sangre seca sobre papel de filtro más el número de muestras negativas en suero y en sangre dividido entre el número total de muestras analizadas por ambos métodos de colección.

La sensibilidad del ensayo para las muestras colectadas sobre papel de filtro se determinó dividiendo el número de verdaderos positivos en sangre, por el número de muestras de suero positivas (expresado en porcentaje). La especificidad fue expresada como el número de muestras de verdaderas negativas en sangre, dividido por el número de muestras de suero negativas (expresado en porcentaje).

Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de los ponches de 20 muestras positivas y 20 muestras negativas, las cuales fueron almacenadas empleando dos variantes: cuatro meses a 4 °C y 30 días a temperatura ambiente. Se analizó el porcentaje de recuperación de la señal de fluorescencia

de las muestras después de almacenadas respecto a la obtenida antes de su almacenamiento.

RESULTADOS Y DISCUSION

En estudios anteriores ya se había evaluado la estabilidad de las muestras de sangre seca colectadas en papel de filtro para el estudio de anticuerpos IgM contra el dengue con resultados satisfactorios.¹¹ Partiendo de estos resultados y previendo una mayor estabilidad de los anticuerpos IgG, evaluamos el procedimiento de elución de las muestras obteniendo una excelente correlación con los resultados de suero cuando esta se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente en el tampón de dilución de las muestras para el ensayo de suero.

En la elución realizada durante 30 minutos se observó una coincidencia del 93 % en los valores de relación de las muestras en comparación con la elución realizada durante una hora que fue del 100 % por lo que para la elución de toda la IgG presente en la muestra de sangre en el ponche se requiere como mínimo una hora para garantizar la coincidencia necesaria con las muestras de suero.

El procedimiento utilizado en el montaje de los eluatos en el paso de incubación de las muestras en las placas de reacción fue de una hora a temperatura ambiente y una hora a 37 °C, observándose que la coincidencia de los resultados para la primera variante fue del 95,3 % siendo para la segunda del 100 %

reflejándose que la temperatura en este paso es crítica para la inmunorreacción.

En los pasos del antígeno, conjugado y sustrato se mantuvo lo establecido en el procedimiento empleado en el UMELISA Dengue IgG en suero.

Las condiciones óptimas de elución y montaje de las muestras de sangre seca en papel de filtro fueron las siguientes:

- ♦ Tiempo de elución: 1 hora.
- ♦ Temperatura de elución: Ambiente (20-25 °C).
- ♦ Tampón de elución: Tris-T 15 mM conteniendo suero de carnero el 5 %.
- ♦ Incubación en la placa de reacción: 1 hora a 37 °C en cámara húmeda.

No resultó necesario el cambio del nivel de corte para las muestras de sangre seca en papel de filtro ya que en las condiciones evaluadas no se observó afectación de la sensibilidad y especificidad del ensayo.

Al comparar los resultados obtenidos entre las muestras de sangre seca sobre papel de filtro y las muestras de suero en el UMELISA Dengue IgG se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9518 (Fig. 1). Este coeficiente ha sido calculado tomando como referencia los resultados de relación de la fluorescencia de las muestras respecto al control positivo en suero comparándolas con este valor de las muestras de sangre colectadas en papel de filtro.

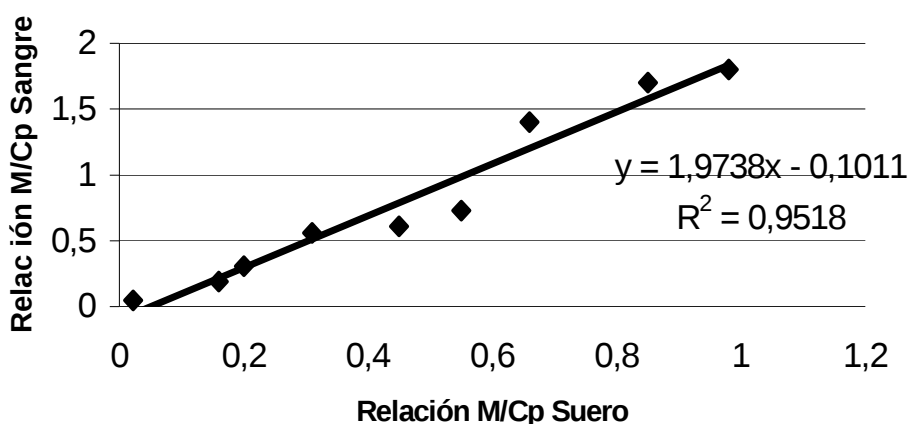


Figura 1. Correlación entre los resultados de relación de la fluorescencia de las muestras de Suero y Sangre seca sobre papel de filtro respecto el control positivo del ensayo.

M: Fluorescencia de la muestra.

Cp: Fluorescencia control positivo.

El porcentaje de sensibilidad, especificidad y coincidencia entre ambas formas de colección fue del 100 % en las muestras analizadas (216 muestras).

La utilización de las mismas condiciones de reacción en las muestras de sangre seca colectadas sobre papel de filtro y las muestras de suero brindan la posibilidad del procesamiento simultáneo de muestras colectadas en ambas formas con igual sensibilidad y especificidad.

En el análisis de la estabilidad de las muestras de sangre colectadas en papel filtro, los resultados muestran una recuperación de la serosidad del 100 % tanto para las muestras almacenadas a 4 °C y como para las almacenadas a temperatura ambiente durante el período evaluado. No se observaron cambios apreciables en los valores de fluorescencia de las muestras negativas. La estabilidad de las muestras colectadas sobre papel de filtro es buena, si son conservadas a 4 °C durante 4 meses y 30 días a temperatura ambiente lo que permite el envío confiable de las muestras y la conservación de las mismas hasta su utilización siempre y cuando el tiempo de este no exceda el evaluado.¹²

Las técnicas de ELISA han sido utilizadas por otros autores demostrando que tienen una alta sensibilidad y especificidad; además, se han realizado estudios comparativos entre los resultados de muestras colectadas por el método de la sangre total seca sobre papel de filtro y sus correspondientes sueros para su utilización en la determinación de la prevalencia a diferentes enfermedades virales.^{13,14}

Los resultados de este estudio muestran que el procedimiento de colección de la muestra de sangre total sobre papel de filtro es útil para la obtención de muestras válidas para su procesamiento por UMELISA.

Esto junto a la posibilidad de obtener la sangre a través de una simple punción digital, puede ser de gran utilidad para estudios epidemiológicos sobre la prevalencia del Dengue.

BIBLIOGRAFIA

1. Monath T. Yellow fever and dengue: the interactions of virus, vector and host in the re-emergence of epidemic disease. **Seminars Virol**, 5, 34, 1994.
2. Organización Panamericana de la Salud: La Salud en las Américas. Vol.1. Publicación Científica No 569, Washington, 1998.
3. Organización Panamericana de la Salud: Resurgimiento del dengue en las Américas. **Boletín Epidemiológico**, 18, 1, 1997.
4. Organización Panamericana de la Salud. Dengue y Dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington, DC: OPS; 1995. (Publicación Científica 548).
5. Farzadegan H., Quinn T., Polk B.F. Detecting antibodies to human immunodeficiency virus in dried blood on paper filter. **J Infect Dis**, 155, 1073, 1987.
6. Wassilak S.G.F., Bernier R.H., Hermann K.L., Orestein W.A., Bart K.J., Amler R. Measles sero-confirmation using dried blood specimens in paper filter. **Pediatr Infect Dis**, 3, 117, 1984.
7. Vázquez S., Fernández R., Llorente C. Utilidad de la sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 33, 309, 1991.
8. Guzmán M.G., Kourí G., Bravo J. Normalización de la toma de muestra de sangre en papel de filtro para la serología del

Dengue. **Rev Cubana Med Trop**, 34, 114, 1982.

9. Fernández JL, García FA, Solís RL, Robaina R, García M, Valdés V et al. The ultramicroanalytic system (SUMA): A versatile technology for clinical testing. International Symposium Biotechnia'91. Biotechnology of growth factors: vascular and nervous systems, 203, 1991.
10. Innis B.L.; Nisalak, A; Nimmannitya, S; Kusalerdchariya, S; Chongswasdi, V; Suntayakorn, S; Puttisri, P & Hoke, C. H. -An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. **Am J Trop Med Hyg**, 40, 418, 1989.
11. Vázquez S., Sáens E., Huelva G., González A., Kourí G., Guzmán M. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. **Rev Panam Salud Publica**, 3, 3, 174, 1998.
12. Ruangturakit S., Rojanasuphot S., Srijuggravanvong A., Duangchanda S., Nuangplee S., Igarashi A. Storage stability of dengue IgM dried on filter paper strips detected by ELISA. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, 25, 560, 1994.
13. Rawat O., Charavante A., Yadav S. Comparison of two blood collection techniques for measles antibody detection in children. **Indian J Med Res**, 114, 1177, 2001.
14. Helfand R.F., Keysenling H.L., Williams I., Murray A., Mei J., Moscattiello C., Icenogle J., Billeni W.J. Comparative detection of measles and Rubella IgM and IgG derived from filter paper blood and serum samples. **J Med Virol**, 65 (4), 751, 2001.