

Estandarización de las condiciones de conservación y elución de muestras de sangre recogidas en papel de filtro para el estudio serológico de la leishmaniosis

SEGUI, M. G.; VALLS, D.; FISA, R.; GALLEGO, M.; PORTUS, M.

Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia. Avda. Diagonal, s/n.
08028 Barcelona.

Summary

Preservation conditions and elution time of blood samples dried on filter paper, for serological diagnosis of canine leishmaniosis by means of Dot-ELISA, are studied.

Titres do not change when blood has been stored from -20° to 25°C for six weeks. After this period titres decrease when the temperature rises.

Elution time of samples stored at -20°C should be increased, according to the period of time after collection, to obtain comparable results.

Key Words: Blood, filter paper, Dot-ELISA, leishmaniosis.

Resumen

Se estudian las condiciones de conservación y tiempo de elución de muestras de sangre recogida sobre papel de filtro, para la determinación serológica de la leishmaniosis canina, mediante una técnica de Dot-ELISA.

Los resultados obtenidos indican que la conservación entre -20° y 25°C durante 6 semanas no altera el título obtenido, que puede variar a partir de este momento en función de la temperatura de conservación.

En cuanto al tiempo de elución en muestras conservadas a -20°C se observa que, para obtener resultados comparables, éste debe aumentar en función del tiempo que lleve la muestra conservada.

Palabras clave: Sangre, papel de filtro, Dot-ELISA, leishmaniosis.

Introducción

La recogida de muestras de sangre sobre papel de filtro es un método muy utilizado en estudios sero-epidemiológicos por la facilidad que representa tanto para la toma, como para su posterior envío, traslado y almacenaje.

Muchos autores han utilizado este sistema en el diagnóstico de distintas enfermedades: Nilsson et al. para la esquistosomosis⁹, Kagan para la malaria⁸, Zhuang et al. para la hepatitis B¹⁶ y Ho et al.⁶ y El Harit et al.⁴ para la leishmaniosis, obteniendo todos ellos muy buenos resultados, totalmente comparables a los obtenidos con muestras de suero^{9, 6}.

En nuestro laboratorio este método de recogida se utiliza de forma habitual para el diagnóstico serológico de la leishmaniosis canina, tanto para las muestras de sangre recogidas en el transcurso de encuestas epidemiológicas, como para aquellas que deban ser remitidas por correo desde lugares geográficamente distantes. Tanto en uno como en otro caso, y por causas diversas, el período transcurrido desde la extracción de la muestra hasta el momento de su estudio puede ser muy variable, lo mismo que las condiciones ambientales, fundamentalmente la temperatura a que estará sometida la muestra durante dicho período de tiempo.

Es, por tanto, muy importante estandarizar

zar todas las variables que intervienen en el proceso para tener la seguridad de obtener resultados fiables y reproducibles.

El objetivo de este trabajo es doble: por un lado determinar la influencia del tiempo y de la temperatura en la estabilidad de muestras de sangre obtenidas sobre papel de filtro para la determinación serológica de la leishmaniosis y, por otro, fijar las condiciones de elución de esta sangre.

La técnica utilizada para la determinación de anticuerpos anti-*Leishmania* ha sido la de "Dot-ELISA" porque, además de ser sensible, específica y reproducible, ha demostrado ser excelente para esta finalidad, como han indicado Serra et al.¹⁵ y Jaffé et al.⁷, superior incluso a la IFI¹⁴, así como por su facilidad de realización.

Material y métodos

Muestras estudiadas

Se han obtenido siete muestras de sangre venosa de otros tantos perros afectados de leishmaniosis; la sangre entera, absorbida sobre rectángulos de papel de filtro Whatman 3, se ha dejado secar completamente, a temperatura ambiente, antes de introducirla en envases de plástico para su conservación.

De cada una de las muestras se han obtenido varios discos, de 6 mm de diámetro y tomados de la zona central de la mancha de sangre, para proceder a los ensayos subsiguientes.

Condiciones de conservación

Han variado dependiendo de si su finalidad era a) el estudio de la influencia del tiempo y de la temperatura en la estabilidad de los anticuerpos o b) del tiempo de elución.

Las muestras 1, 2 y 3 se han dividido en tres partes y cada una de ellas se ha conservado, hasta el momento del análisis, a una de las siguientes temperaturas:

- temperatura ambiente: 20-25°C
- frigorífico: 2-8°C
- congelador: -20°C

Quincenalmente, durante un período de tres meses, se ha procedido a la determinación de anticuerpos anti-*Leishmania* en un disco de cada una de las muestras conservadas a cada una de estas temperaturas.

Las muestras 4, 5, 6 y 7 se han conservado en congelador (-20°C), durante los tiempos que se indican, hasta el momento de ser procesadas para el estudio del tiempo de elución:

- muestra n.º 4: 32 días
- muestra n.º 5: 65 días
- muestra n.º 6: 287 días
- muestra n.º 7: 379 días

Elución de las muestras

Cada uno de los discos de papel saturado de sangre se ha eluido en 250 µl de tampón TS-tween-1% leche descremada y se ha considerado que correspondía a una dilución sérica aproximada de 1/100⁵.

El tiempo ha variado en función del objetivo del ensayo, pero siempre, salvo que se indique lo contrario, a temperatura ambiente y con agitación mecánica a 175 r.p.m.

Las muestras 1, 2 y 3, dedicadas al estudio de las condiciones de conservación, se han eluido todas por igual durante un período de 30 min.

Siete discos de cada una de las muestras 4, 5, 6 y 7 se han eluido de la forma indicada, pero variando el tiempo para obtener unos períodos de elución de 10, 20, 30, 60, 90 y 120 min. y 20 horas, esta última en frigorífico y sin agitación.

Determinación del título de anticuerpos anti-*Leishmania*

Se ha utilizado la técnica de "Dot-ELISA" descrita por Pappas et al.^{10, 12} con algunas modificaciones para su adaptación al uso del aparato de microfiltración Bio-Dot (Bio-Rad Laboratories) que simplifica la metodología, al utilizar membranas de nitrocelulosa enteras en lugar de discos introducidos en placas de micro-ELISA convencionales.

Pasamos a describir brevemente la técnica utilizada:

Tabla 1
Dot-ELISA-*Leishmania*
Influencia del tiempo y de la temperatura en la estabilidad de muestras de sangre en papel de filtro

	Tiempo días	Temp. ambiente (20-25°C)	Temp. nevera (2-8°C)	Temp. congelador (-20°C)
Muestra n.º 1	0	1/1600	1/1600	1/1600
	15	1/3200	1/3200	1/3200
	27	1/1600	1/1600	1/3200
	41	1/1600	1/1600	1/3200
	57	no valorable		
	69	1/800	1/1600	1/3200
	83	1/800	1/1600	1/1600
	97	1/400	1/800	1/1600
	Muestra n.º 2	0	1/1600	1/1600
15		1/1600	1/1600	1/1600
27		1/1600	1/1600	1/1600
41		1/1600	1/1600	1/1600
57		1/800	1/1600	1/1600
69		1/800	1/1600	1/1600
83		1/800	1/800	1/1600
97		1/400	1/800	1/1600
Muestra n.º 3		0	1/400	1/400
	15	1/800	1/800	1/800
	27	1/400	1/400	1/800
	41	1/400	1/400	1/800
	57	no valorable		
	69	1/100	1/200	1/400
	83	1/200	1/400	1/800
	97	1/200	1/200	1/400

Tabla 2
Dot-ELISA-*Leishmania*
Influencia del tiempo de elución de muestras de sangre en papel de filtro

Muestra n.º	4	5	6	7
Días conserv.	32	65	287	379
10 min.	1/6400	1/3200	1/1600	1/3200
20 min.	1/6400	1/3200	1/1600	1/6400
30 min.	1/6400	1/3200	1/3200	1/12800
60 min.	1/12800	1/6400	1/6400	1/12800
90 min.	1/25600	1/12800	1/12800	1/25600
120 min.	1/25600	1/12800	1/25600	1/25600
20 h.	1/12800	1/6400	1/3200	1/12800

Antígeno: se han utilizado promastigotes formolados de una cepa autóctona de *Leishmania infantum* MCAN/SP/84/BCN-3-Z-MON-1.

Preparación del antígeno para "Dot-ELISA": la cepa indicada se ha cultivado en medio NNN con Penicilina (1000 U/ml) durante 7-10 días en botellas de cultivo; de la fase líquida obtenida se ha separado el sedimento por centrifugación y se ha resuspendido en solución salina 3 por mil para lisar los posibles hematíes; después de tres lavados con sol. salina 9 por mil, se ha resuspendido el sedimento con sol. formalina 2% y se ha ajustado la concentración para obtener una suspensión de 1×10^5 promastigotes/ μ l, que puede conservarse en frigorífico durante varios meses.

Preparación de las membranas de nitrocelulosa: la membrana Millipore seca se ha colocado en el aparato Bio-Dot. Mediante una jeringa de Hamilton se ha depositado 1 μ l de la suspensión de promastigotes en cada pocillo y, fuera ya del aparato, se ha estabilizado dejándola secar durante 1 h a 37°C; el bloqueo se ha llevado a cabo introduciéndola en TS-tween-5% leche descremada durante 30 min. Estas membranas después de lavarse con TS pueden almacenarse a -20°C¹².

Metodología del Dot-ELISA: todos los pasos se han realizado a temperatura ambiente (20-25°C) y para todas las soluciones de trabajo se ha utilizado solución tris-salina TS (Tris 20mM, ClNa 0,13M, pH 7,6). En cada serie se han introducido sueros controles positivos y negativos, además de controles de reactivos.

- Incubación del anticuerpo: después de colocar la membrana ligeramente humedecida en el Bio-Dot, se ha procedido a preparar diluciones dobles, a partir del eluido (1/100), en TS-tween-1% leche descremada y se ha dejado incubar durante 30 min.

- Lavado: dos veces con TS-tween (Tween 20 al 0,05% en TS) y dos veces con TS.

- Conjugado: se han adicionado 50 μ l

de conjugado de Proteína-A-peroxidasa (Sigma 1/1000) a cada pocillo y se ha dejado incubar durante 45 min.

- Lavado: igual que el anterior.

- Sustrato enzimático: extemporáneamente se ha preparado una solución con 2 ml de sol. 4-cloro-1-naftol (Merck) en metanol anhidro (3 mg/ml), conservado en frasco oscuro y nevera, 8 ml de TS-500 mM y 6 μ l de H₂O₂ 30% y en ella se ha sumergido la membrana una vez fuera del aparato.

Después de 20-30 min. se ha parado la reacción lavando con agua y posteriormente se ha secado la membrana entre hojas de papel de filtro.

- **Lectura:** se han considerado resultados positivos los que han dado lugar a la aparición de una mancha azul bien definida en el punto de deposición del antígeno.

Resultados

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos para las muestras 1, 2 y 3 sometidas a distintas condiciones de conservación.

En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos para las muestras 4, 5, 6 y 7 según el tiempo de elución.

Discusión

De los resultados obtenidos en muestras de sangre mantenidas bajo distintas condiciones, se desprende que el título de anticuerpos anti-*Leishmania* se mantiene invariable durante los primeros 41 días sea cual sea la temperatura de conservación; estos resultados concuerdan con los obtenidos por Nilsson et al.⁹, quienes han estudiado el título de anticuerpos anti-*Schistosoma mansoni* por la técnica Dig-ELISA y no han obtenido diferencias apreciables después de conservar las muestras durante seis semanas a temperaturas comprendidas entre 4 y 37°C.

Transcurrido este tiempo los títulos obtenidos se modifican en función de la temperatura, de tal manera que a los tres meses a 2-8°C se percibe un ligero descenso de la positividad (una dilución), a temperatura ambiente el descenso es más apreciable (1-2 diluciones) y a -20°C no se observa variación.

A esta misma conclusión llega Kagan⁸ cuando utiliza sangre en papel de filtro en estudios epidemiológicos para la malaria.

En cuanto al tiempo de elución, se observa un aumento del título de anticuerpos en función de este tiempo; este aumento va desde 2 diluciones (4x) en las muestras más recientes hasta 4-8 diluciones (8-16x) en las muestras que lleven más tiempo conservadas.

Por otra parte, la elución de la muestra durante 20 h en frigorífico no ha dado, en ningún caso, resultados superiores a los obtenidos después de eluir durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación.

Estos tiempos concuerdan con los citados por otros autores en sus trabajos^{6, 1}.

Conclusiones

A partir de todo ello concluimos que:

La estabilidad de muestras de sangre tomadas sobre papel de filtro, en estudios sobre la leishmaniosis, permite mantener la muestra en condiciones ambientales el tiempo suficiente para la realización de trabajos de campo, envío, etc...

De todas maneras, cuando su estudio deba demorarse un largo período de tiempo resulta conveniente su almacenaje a -20°C.

Este tiempo de almacenaje debe tenerse en cuenta a la hora de eluir la muestra de forma que, si es inferior a 2 meses, es suficiente con un tiempo de una hora, pero, si ha sido conservada durante un mayor tiempo, es aconsejable prolongarlo hasta dos horas.

Referencias

1. Chan, S. W.; Ko, R. C. "Comparison between standard ELISA and dot-ELISA for serodiagnosis of human trichinosis". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82, 1988, 892-894.
2. El Amin El Roufaie, M.; Wright, E. P.; Kager, P. A.; Laarman, J. J.; Pondman, K. W. "ELISA using intact promastigotes for immunodiagnosis of kala-azar". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 79, 1985, 344-350.
3. El Amin El Roufaie, M.; Wright, E. P.; Rahman, A. M. A.; Kolk, A.; Laarman, J. J.; Pondman, K. W. "Serodiagnosis of Sudanese visceral and mucosal leishmaniasis: comparison of ELISA-immunofluorescence and indirect haemagglutination". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 80, 1986, 271-274.
4. El Harit, A.; Kolk, A. H. J.; Leeuwenburg, R. M.; Huigen, E.; Jelsma, T.; Kager, P. A. "Improvement of a direct agglutination test for field studies of visceral leishmaniasis". *J. Clin. Microbiol.*, 26, 1988, 1321-1325.
5. Fisa, R.; Gállego, M.; Portús, M.; Mora, R. "La técnica Dot-ELISA-proteína A-peroxidasa y su utilización en el estudio seroepidemiológico de los reservorios de *Leishmania*". *Libro de actas del V Congreso de Parasitología*. Salamanca (1987).
6. Ho, M.; Leeuwenburg, G.; Mbugua, G.; Wamachi, A.; Voller, A. "An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of visceral leishmaniasis". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 32, 1983, 943-946.
7. Jaffe, L.; Zalis, M. "Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis". *J. Infect. Dis.*, 157, 1988, 1212-1220.
8. Kagan, I. "Evaluation of the indirect hemagglutination test as an epidemiologic technique for malaria". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21, 1972, 683-689.
9. Nilsson, L. A.; Bjorck, L.; Ouchterlony, O. "Paper discs impregnated with capillary blood. A sampling technique for immunoassays by means of DIG-ELISA and DIG-TIA". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 1985, 314-318.
10. Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Diggs, C. L.; Hockmeyer, W. T. "Disposable nitrocellulose filtration plates simplify the Dot-ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis".

Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79, 1985, 136.

11. **Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Hockmeyer, W. T.** "Dot enzyme linked immunosorbent assay (Dot-ELISA): a micro technique for the rapid diagnosis of visceral leishmaniasis". *J. Immunol. Meth.*, 64, 1983, 205-214.
12. **Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Hockmeyer, W. T.** "Standardization of the dot enzyme-linked immunosorbent assay (Dot-ELISA) for human visceral leishmaniasis". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 33, 1984, 1105-1111.
13. **Pappas, M. G.; Hajkowski, R.; Tang, D. B.; Hockmeyer, W. T.** "Reduced false positive reactions in the Dot-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for human visceral leishmaniasis". *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 34, 1985, 392-396.
14. **Portús, M.; Fisa, R.; Serra, T.; Riera, C.; Muñoz, C.; Prats, G.** "Las técnicas de IFI y Dot-ELISA en el diagnóstico y control del kala-azar autóctono". *Libro de actas del V Congreso de Parasitología*. Salamanca (1987).
15. **Serra, T.; Fisa, R.; Portús, M.; Canut, L.; Gállego, M.** "Estudio Comparativo de las técnicas de IFI, ELISA y Dot-ELISA en el diagnóstico de la leishmaniosis canina". *Libro de actas del V Congreso de Parasitología*. Salamanca, 1987.
16. **Zhuang, H.; Coulepis, A. G.; Locarnini, S. A.; Gust, I. D.** "Detection of markers of hepatitis B infection in serum dried on to filter-paper: an application to field studies". *Bull. W.H.O.*, 60, 1982, 783-787.

(Recibido el 5 de septiembre de 1990; aceptado el 2 de noviembre de 1990).

Trabajo subvencionado por la DGICYT, proyecto PB86-0546.