

ULTRAMICROELISA INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS TOTALES A CITOMEGALOVIRUS EN SUERO HUMANO

Jose LAFERTE (1), Miguel MARRERO (1), Maritza ALVAREZ (1), Liliانا JOMARRON (1), Serafina GARCIA (1), Susana VAZQUEZ (1), Luis MORIER (1), Mario ULACIA (2) & Antonio MELCHOR (3)

RESUMEN

Se normalizó un ultramicroELISA indirecto para la detección de anticuerpos a Citomegalovirus (CMV) humano (UMELISA CMV). Se determinó la concentración óptima de antígeno en 30 ug/ml, la dilución de los sueros fue de 1:40 y la dilución de trabajo del conjugado fue de 1:1500. El UMELISA CMV fue comparado con las técnicas de aglutinación de latex para anticuerpos anti-CMV (Dupont de Neumors) y la inmunofluorescencia indirecta (IFI). Los resultados mostraron un alto grado de concordancia y elevada copositividad y conegatividad del UMELISA con respecto a estos dos ensayos. El método es válido para el pesquiasaje de anticuerpos en banco de sangre así como para el diagnóstico de la infección mediante sueros pareados.

UNITERMOS: UltramicroELISA; Citomegalovirus.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones por herpes virus y en especial por Citomegalovirus constituyen un grave problema de salud en muchos países por las afecciones que producen en recién nacidos e inmunodeprimidos^{4,10,11,20}.

La prevalencia de la infección por CMV medida por la presencia de anticuerpos específicos varia de un 40-90% en los diferentes estudios, siendo más elevada en los grupos con nivel socioeconómico más bajo¹⁵.

La serología de CMV es de utilidad en: a) diagnóstico de la infección por seroconversión o aumento del título de anticuerpos de 4 veces o más, b) conocer el estado inmunitario de una población en riesgo o no a este agente, c) selección de donantes seropositivos para la producción de gammagobulinas hiperinmunes, d) creación de un banco de sangre o hemoderivados provenientes de personas seronegativas a CMV para proteger de la infección a pacientes inmunodeprimidos o recepto-

res de sangre por cualquier tipo de cirugía, trastorno o enfermedad^{1,5}. La detección de anticuerpos a CMV ha sido realizada por diferentes técnicas como la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), Inmunofluorescencia Anticomplementaria (IFC), el ELISA, Radioinmunoensayo (RIA) y la técnica de Aglutinación de Latex, probando todos estos métodos ser útiles para el pesquiasaje de anticuerpos a CMV^{6,8,9,13}.

El sistema ultramicroanalítico (SUMA) descrito originalmente para el procesamiento de muestras en laboratorio clínico¹² ha sido modificado y adaptado para la realización de ensayos inmunoenzimáticos con diversos fines como han sido su utilización en el pesquiasaje de anticuerpos monoclonales¹⁶.

En el presente trabajo se describe la normalización y aplicación del SUMA a la detección de anticuerpos totales a CMV (UMELISA CMV).

(1) Departamento de Virología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Siboney. Ciudad Habana, Cuba.

(2) Banco de sangre provincial. Ciudad Habana, Cuba.

(3) Centro de Inmunoensayo. Ciudad Habana, Cuba.

Dirección para correspondencia: Lic. José Laferté: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado Postal N° 601. Ciudad Habana, Cuba.

MATERIALES Y METODOS

Muestras de suero

Se colectaron 215 muestras de donantes de sangre obtenidas del Banco provincial de Ciudad Habana y 202 muestras enviadas al Laboratorio de Diagnóstico Virologico del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" de pacientes con sospecha de infección citomegálica de las cuales 140 provenían de pacientes infectados con Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), 52 muestras de pacientes del Instituto de Nefrología (hemodializados o sometidos a transplante de riñon) y 10 muestras de recién nacidos con posible infección congénita por CMV.

Se obtuvieron además donaciones de banco de sangre con resultado positivo y negativo respectivamente al ensayo de aglutinación de latex para anticuerpos (Dupont de Nemours), las cuales fueron utilizadas como sueros controles de referencia en el ensayo de ultramicroELISA.

Aglutinación de latex (CMV)

La detección de anticuerpos a citomegalovirus en el Banco de Sangre se realizó por un kit comercial de aglutinación de latex (Dupont de Nemours), interpretándose los resultados de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Inmunofluorescencia Indirecta

En los sueros del laboratorio IPK la detección de anticuerpos se realizó por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) según LANDINI y cols¹³, considerándose positivos aquellos casos con una fluorescencia nuclear característica de CMV a partir de una dilución 1:20.

Sistema Ultramicroanalítico (SUMA)

El sistema SUMA esta compuesto por un espectrofotómetro-fluorímetro automático (SUMA 121) acoplado a una microcomputadora, en el cual se realizan las lecturas de las placas y una multipipeta computarizada de 96 posiciones (ERIZO 101) con la cual se realizan las diluciones de las muestras y distribuyen los volúmenes de los reactivos. Se utilizan además otros accesorios adecuados para el trabajo con el sistema tales como

cubetas de dilución para las muestras de suero y multicubetas de cuarzo de 96 posiciones utilizadas para la lectura de la reacción (Centro de Inmunoensayo. Ciudad Habana, Cuba).

Purificación de antígeno para UMELISA CMV

Las células diploides humanas de pulmón (PH) obtenidas en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Instituto "Pedro Kouri", fueron infectadas con la cepa de CMV AD169 a una multiplicidad de 100 unidades formadoras de placa (UFP/ml). La extracción se realizó cuando el 80-90% de las células presentaron un efecto citopático. Las células se desprendieron mecánicamente en una solución de KCl al 0.4% se lavaron y homogenizaron con Nonidet P 40 al 0.5%.

El homogenizado fue centrifugado a 2000 rpm en un colchón de sacarosa 0.25M, el pellet se resuspendió en PBS/TRIS pH 9.6 y se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación. Posteriormente se realizó la sonicación en tres ciclos de 30 segundos, con una intensidad de 20 hz. La misma metodología se siguió para la preparación del control celular (C). La conservación del antígeno (Ag) y del control (C) se realizó a -80°C hasta su utilización. La concentración de proteínas en ambos casos se determinó mediante el método de Lowry¹⁴.

Conjugado

Un conjugado anti inmunoglobulinas humanas totales con Bgalactosidasa fue obtenido el Centro de Inmunoensayo. Ciudad Habana, Cuba.

Sustrato

El sustrato fluorigénico de la Betagalactosidasa (4 metillumberyl beta D galactopiranosido) fue suministrado por el Laboratorio de síntesis química de la Universidad de la Habana, en el ensayo se utilizó a una concentración de 0.4 mg/ml en tampón TRIS 15 mM pH 7.8. Como solución fluorescente de referencia se utilizó la 4 metillumbelliferona (Koch Light Limited, Harvehall, Suffok, England).

Normalización del UMELISA CMV

Las placas de ultramicroELISA de cloruro de polivinilo (Centro de Inmunoensayo. Ciudad Ha-

baña, Cuba) se sensibilizaron con el antígeno de CMV (Ag) y el control celular (C) previamente diluidos en buffer carbonato-bicarbonato pH 9.6 durante 18 horas a 4°C, y estas se conservaron a 4°C hasta el momento de su utilización. La dilución de las muestras y sueros controles se realizó en buffer tris-Tween 15 mM conteniendo suero de carnero al 5% con la ayuda de la multipipeta ERIZO 101. Posteriormente se distribuyeron 10 ul por pocillo de estas diluciones en paralelo contra el antígeno y el control y se incubó durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda. Al término de este tiempo se realizaron 4 ciclos de lavados con buffer Tris Tween 15 mM y se adicionó la dilución de trabajo del conjugado (1:1500) preparada en el mismo diluyente de las muestras. La incubación y el lavado se realizó de la misma forma que el paso anterior.

Utilizando la multipipeta se dispensaron 10 ul de solución de sustrato en cada pocillo y se realizó la incubación durante 30 minutos a 37°C, terminado este tiempo todo el contenido de la placa de reacción fue transferido a una multicuveta de cuarzo de 96 posiciones y se realizó la lectura en el espectroflorímetro. Los resultados fueron expresados por la relación Fm/Fp donde:

Fm = Fluorescencia de la muestra (Ag-C)
Fp = Fluorescencia del control positivo (Ag-C)

RESULTADOS

En el presente trabajo se logró normalizar un ultramicroelisa para la detección de anticuerpos totales a CMV. Las concentraciones óptimas de recubrimiento para el antígeno y el control celular, así como las diluciones adecuadas de los sueros y el conjugado se establecieron titulando por separado cada uno de los componentes del sistema seleccionándose aquellas condiciones que permitieran una adecuada discriminación entre los sueros controles negativos y positivos utilizados. Mediante estas pruebas se decidió utilizar una concentración de antígeno de 30 ug/ml, una dilución de suero de 1:40 y el conjugado se utilizó diluido 1:1500. En la figura 1 se muestra la titulación de antígeno de recubrimiento utilizando las diluciones establecidas de suero y conjugado. El valor de corte se ajustó mediante el estudio de sueros negativos, positivos y altos positivos obtenidos por la técnica de latex CMV. Se consideraron positivos por UMELISA CMV aquellos sueros en que la relación Fm/Fp era > 0,2.

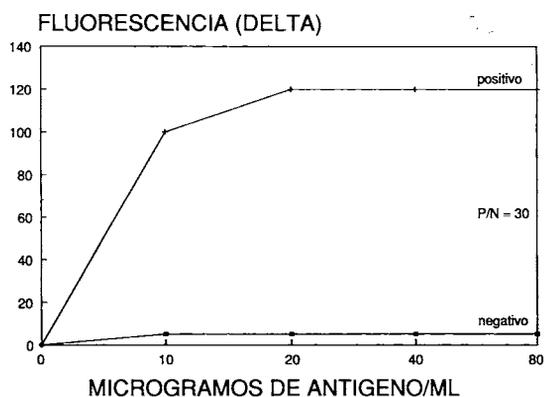


Figura 1. Determinación de la dosis óptima de antígeno de recubrimiento en el UMELISA CMV utilizando dilución del conjugado 1:1500 y dilución de los sueros controles 1:40.

Comparación con latex CMV

La evaluación de un método de anticuerpos a CMV puede ser difícil por la falta de pruebas de referencia existentes, no obstante el kit de latex para la detección de anticuerpos a CMV (Dupont Nemours) ha sido evaluado por diferentes autores con buenos resultados^{3,6,17}. En este estudio se evaluaron 215 muestras de suero provenientes de un banco de sangre provincial de Ciudad Habana, las cuales han sido previamente analizadas por la técnica del latex que se refiere. La seropositividad general fue de un 79% para el UMELISA CMV y de un 78% para el latex. Ambas técnicas presentaron un 95.8% de coincidencia y UMELISA CMV con relación al latex presentó un 96.4% de copositividad y un 93.3% de conegatividad (Tabla 1). Se obtuvieron 9 sueros con resultados discordantes, 6 positivos por latex y negativos por UMELISA CMV y 3 positivos por UMELISA CMV y negativos por latex. Los valores de estos sueros discordantes siempre fueron al rededor del valor de corte fijado ($V_c = 0,2$) de forma que la media de los 6 sueros discordantes negativos por UMELISA CMV fue de 0,192 y la media de los 3 sueros discordantes positivos por UMELISA CMV fue de 0,205. Estos 9 sueros fueron estudiados por IFI y los resultados obtenidos coincidieron plenamente con el UMELISA CMV.

Comparación con IFI CMV

El estudio comparativo del UMELISA CMV y la técnica de IFI para la detección de anticuerpos a CMV se realizó utilizando 202 muestras de suero

pertencientes al laboratorio del IPK. El UMELISA CMV con respecto a la técnica de IFI presentó un 99.4% de copositividad, un 98.5% de coincidencia y un 80% de conegatividad (Tabla 2). Se obtuvieron solo 3 muestras discordantes que presentaron valores muy cercanos al valor de corte del UMELISA CMV, resultando una muestra negativa por UMELISA CMV y positiva por IFI y dos muestras positivas por UMELISA CMV y negativas por IFI.

Tabla 1.

Comparación del UMELISA CMV y la técnica de aglutinación del latex en 215 muestras de suero de donantes de sangre

	UMELISA CMV		
	Positivo	Negativo	
Prueba de aglutinación del latex	164	6	170
	3	42	<u>45</u>
			215

Copositividad: 96.4%

Conegatividad: 93.3%

Coincidencia: 95.8%

Tabla 2.

Comparación del UMELISA CMV y la técnica de inmunofluorescencia indirecta en 202 muestras de pacientes con sospecha de infección citomegalica

	UMELISA CMV		
	Positivo	Negativo	
IFI	191	1	192
	2	8	<u>10</u>
			202

Copositividad: 99.4%

Conegatividad: 80.0%

Coincidencia: 98.5%

DISCUSION

Numerosos autores han descrito la transmisión de CMV a través de transfusiones de sangre, lo cual puede afectar de manera importante la evolución y el pronóstico de los pacientes que necesiten transfusiones frecuentes^{2,7,10,18}. Diversos sistemas han sido aplicados para prevenir la transmisión de CMV por transfusiones sobre todo en los progra-

mas de trasplantes de órganos y uno de los métodos mas exitosos consiste en aplicar a los receptores seronegativos a CMV hemoderivados provenientes de donantes también seronegativos, por tanto el UMELISA CMV puede ser útil para el pesquisaje de anticuerpos a CMV en bancos de sangre, facilitando la manipulación de un gran número de muestras y permitiendo la selección apropiada de los donantes para la creación de un banco de hemoderivados seronegativos que permita proteger la infección por CMV a los pacientes con mayor riesgo de adquirir la infección.

El UMELISA CMV concordó mejor en sus resultados con la técnica de IFI y los 3 resultados discordantes pueden explicarse por la subjetividad de la lectura de los ensayos de inmunofluorescencia, lo cual ha sido referida por otros autores¹⁹.

El UMELISA CMV presentó altos niveles de copositividad, conegatividad y concordancia al compararlo con sistemas ya establecidos de forma que la técnica ultramicroanalítica representa una novedosa alternativa para afrontar la detección de anticuerpos totales a CMV, con fines epidemiológicos, diagnósticos o preventivos, presentando un nivel de automatización de los procedimientos que permite una elevada productividad.

SUMMARY

Indirect Ultramicroelisa assay for the detection of human antibodies to cytomegalovirus using human serum samples

We have standardized an indirect ultramicro ELISA assay for detecting antibodies to human Cytomegalovirus (CMV) using human serum samples (UMELISA CMV). The optimal concentration of coating antigen (30 ug/ml), serum dilution (1:40) and anti-human conjugate working dilution (1:1500), were determined by a check board titration method. The UMELISA CMV was compared with the latex agglutination test for antibodies to CMV (Dupont de Nemours) and with an indirect immunofluorescent method. The results have showed the high coincidence, sensitivity and specificity of the proposed assay regarding the two methods compared with, and supporting its use either for a blood donors screening or in the serological diagnosis of this infection by paired serum samples.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ADLER, S.P.- Transfusion associated cytomegalovirus infection. *Rev. infect. Dis.*, **5**: 933-977, 1983.
2. ADLER, S.P.; LAWRENCE, L.T & BAGGET, J.- Prevention of transfusion associated CMV infection in very low birthweight infants using frozen blood and donors seronegative for CMV. *Transfusion*, **24**: 333-335, 1984.
3. ADLER, S.P.; Mc VOY, M.; BIRO, B.G.; BRITT, W.J.; HIDER, P. & MERSHALL, D.- Detection of cytomegalovirus antibody with latex agglutination. *J. clin. Microbiol.*, **22**: 68-70, 1985.
4. ALVAREZ, M.; MARRERO, M.; SOLER, M.; PUIG, L. & MORENO, D.- Diagnóstico rápido de citomegalovirus en pacientes inmunocomprometidos mediante AcM que reconocen proteínas precoces virales. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **84**: 265-268, 1989.
5. BAUMGARTNER, J.D.; GLAUSER, M.P.; BURGO-BLACK, A.L.; BLACK, R.D.; PYNDIAH, N. & CHIOLERO, R.- Severe cytomegalovirus infection in multiply transfused, splenectomised, trauma patients. *Lancet*, **2**: 63-66, 1982.
6. BECKWITH, D.G.; HALSTEAD, D.C.; ALPAUGH, K.; SCHWEDEN, A.; BLOONT-FRONEFIELD, D.A. & TOTH, K.- Comparison of latex agglutination test with five other methods for determining the presence of antibody against cytomegalovirus. *J. clin. Microbiol.*, **21**: 328-331, 1986.
7. BENEKE, J.S.; TEGTMEYER, G.E.; ALTER, H.J.; LUETKEMEYER, R.; SOLOMEN, R. & BAYER, W.L.- Relation of titres of antibodies to CMV in blood donors to the transmission of CMV infection. *J. infect. Dis.*, **150**: 883-888, 1984.
8. BOOTH, J.C.; HANNINGTON, G.; BAKER, T.M.F.; STERN, H.; KANGRO, H.; GRIFFITH, P.D. & HEATH, R.B.- Comparison of Enzyme-Linked immunosorbent assay, radioimmunoassay, complement fixation, anticomplement immunofluorescence and pasive hemagglutination techniques for detecting cytomegalovirus IgG antibody. *J. clin. Path.*, **35**: 1345-1348, 1982.
9. CASTELLANO, G.A.; HAZZAR, G.T.; MADDEN, D.L. & SEVER, J.L.- Comparison of the ELISA and the indirect hemagglutination test for detection of antibody to cytomegalovirus. *J. infect. Dis.*, **136**: 5337-5340, 1977.
10. DUMMER, J.S.; WHITE, L.T.; HO, M.; GRIFFITH, B.T.; HARDESTY, R.L. & BAHNSON, H.T.- Morbidity of cytomegalovirus infection in recipients of heart or heart-lung transplants who received cyclosporine. *J. infect. Dis.*, **152**: 1182-1191, 1985.
11. FORBES, B.A.- Acquisition of cytomegalovirus infection. An update. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**: 204-216, 1989.
12. HORN, A.; FERNANDEZ YERO, J.L. & SCHULZE, M.- UltramicroELISA for alphafetoprotein with the chamber analytical technique. *J. clin. Chem. clin. Biochem*, **19**: 702, 1981.
13. LANDINI, M.P.; R.E.M.C. & COPPOLECCHIA, P.- Comparison of the occurrence of antibodies to human cytomegalovirus as demonstrated by complement fixation. Enzyme Linked immunosorbent assay and indirect immunofluorescence. *Boll. Inst. sieroter. milan.*, **61**: 320-323, 1982.
14. LOWRY, D.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J.- Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
15. ONORATO, I.M.; MOVENS, D.M.; MARTONE, W.J. & STANSFIELD, S.K.- Epidemiology of cytomegalovirus infections: Recommendations for prevention and control. *Rev. infect. Dis.*, **7**: 479-496, 1985.
16. OTERO, A.J.; SARRACENT, J.; FERNANDEZ YERO, J.L. & RODRIGUEZ, I.- A 10 microliter ultramicroELISA for detection of monoclonal antibodies against human alphafeto protein. *Hybridoma*, **3**: 391, 1984.
17. PHIPPS, P.H.; GREGOIRE, L.; ROSSIER, E. & PERRY, C.- Comparison of five methods of cytomegalovirus antibody screening of blood donors. *J. clin. Microbiol.*, **18**: 1296-1300, 1983.
18. PRINCE, A.M.; SZMUNESS, W.; WILLIAN, S.J. & DAVID, D.S.- A serologic study of cytomegalovirus infection associated with blood transfusion. *New Engl. J. Med.*, **284**: 1125-1131, 1971.
19. RIGGS, J.L.- Immunofluorescent staining. In: LENNETTE, E.H. & SCHMIDT, N.J., ed.- Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5th. ed. Washington, Am. Pub. Health Association, 1979. p. 141-151.
20. YOW, M.D.- Congenital cytomegalovirus diseases. A new problem. *J. infect. Dis.*, **159**: 163-167, 1989.

Recebido para publicação em 16/5/1990.

Aceito para publicação em 06/12/1991.