INTERÉS CLÍNICO

Desde que Hunter y Brennan (1) caracterizaron al Glicolípido Fenólico I como antígeno específico de *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), éste y los antígenos (Ag) sintéticos que reproducen su sector inmunodominante (2-5) han sido utilizados ampliamente en estos últimos años en estudios serológicos de diversas poblaciones (6- 9). Los resultados obtenidos con ensayos de tipo ELISA para determinar el nivel de anticuerpos (Ac) en diversas poblaciones (10- 15) han demostrado que:

- La respuesta serológica a estos Ag, es de tipo IgM.
- El nivel de Ac presentes se corresponde con la carga bacilar, aumentando desde el polo tuberculoide hasta el polo lepromatoso
- La mayoría de los pacientes con lepra lepromatosa tienen Ac a estos Ag.
- Los niveles de Ac específicos disminuyen con la quimioterapia
- La seropositividad precede al diagnóstico en la mayoría de los casos, y particularmente en los pacientes lepromatosos, los cuales tienen muy altos títulos de Ac al momento del diagnóstico clínico
- Aproximadamente un 30 % de los contactos domiciliarios de enfermos de lepra presentan respuesta positiva a este tipo de ensayo, pero muchos de ellos no desarrollarán la enfermedad. No obstante, este tipo de estudios permite seleccionar a aquellos que deben ser objeto de investigaciones ulteriores que confirmen o descarten el diagnóstico de lepra.

El UMELISA HANSEN puede utilizarse en la detección de anticuerpos IgM contra *M. leprae* en muestras de suero para:

1.- Pesquisaje de infección clínica o subclínica en áreas endémicas o en grupos de riesgo.

2.- Monitoreo del curso de la enfermedad y evaluación del tratamiento.

FUNDAMENTO DEL ENSAYO

El UMELISA HANSEN es un ensayo inmunoenzimático indirecto en el cual se utiliza como fase sólida tiras con ocho pocillos recubiertos previamente con antígeno sintético especie-específico de *M. leprae*. Las muestras se incuban en los pocillos y si éstas contienen anticuerpos específicos se fijarán al antígeno del recubrimiento. A continuación, previo lavado que elimina los componentes no fijados, se añade un conjugado Anti IgM Humana (Carnero)/Fosfatasa Alcalina (F.A.).

En caso de reacción positiva, este anticuerpo marcado se unirá al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Un nuevo lavado de las tiras elimina ahora el conjugado en exceso. Al añadir un sustrato fluorigénico (4-metilumbeliferil fosfato), éste será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos IgM contra *M. leprae*.

CONTENIDO DEL ESTUCHE Y PREPARACION DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO

Código UM 2008 (288 pruebas)

Contenido:

Placa recubierta de 12 tiras x 8 pocillos	3
R1: Solución Tampón	2 x 25 mL
R2: Suero de Carnero	1 x 18 mL
R3: Control Negativo	1 x 0,5 mL
R4: Control Positivo	1 x 0,5 mL
R5: Conjugado	1 x 7,5 mL
R6: Sustrato	1 x 2 mL
R7: Tampón Sustrato	1 x 18 mL

El lote de las placas recubiertas se muestra en el borde de su envase primario, el cual está compuesto por cinco dígitos, los cuatro primeros representan la fecha de vencimiento de las placas y el quinto representa un indicador numérico interno del proceso de producción.

Todos los reactivos contienen azida sódica (0,2 g/L) como preservante.

Los controles resultaron ser negativos a las pruebas de detección de Anti-VIH 1+2, HBsAg, Anti-VHC y Sífilis.

Preparación de las soluciones de trabajo:

R1: Para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R2: Diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 mL (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare sólo lo necesario para el ensayo.

R3: Listo para usar.

R4: Listo para usar.

R5: Listo para usar. Cantidad necesaria por tira: 0,2 mL

R6: Diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira: 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7). Prepare inmediatamente antes de usar y sólo lo necesario para el ensayo.

CONSERVACIÓN Y ESTABILIDAD

Todos los reactivos deben mantenerse entre 2 y 8 ºC. En estas condiciones, serán estables en el envase original hasta la fecha de vencimiento.

Después de utilizar parte del contenido de los reactivos, el resto es estable durante 2 meses si se mantienen las mismas condiciones de almacenamiento y se evita la contaminación durante la ejecución de la prueba.

Las tiras de reacción no utilizadas se mantienen estables durante 2 meses entre 2 y 8 ºC en la bolsa suministrada, protegida con el desecante y herméticamente cerrada.

MATERIALES NECESARIOS NO SUMINISTRADOS

- Agua destilada.
- Papel absorbente.
- Hipoclorito de Sodio.
- Pipeta multicanal con puntas desechables para 10 µL.
- Pipetas de precisión entre 5 y 1000 µL.
- Probetas graduadas entre 10 y 250 mL.
- Incubadora a 37 ± 1 ºC.

PRECAUCIONES

- Antes de comenzar a trabajar, verifique que todos los reactivos estén completamente homogéneos y a temperatura ambiente.
- Manipule las muestras y los controles como potencialmente infecciosos. Utilice guantes desechables. Los materiales utilizados deben colocarse en soluciones desinfectantes (Hipoclorito de Sodio al 5%) o esterilizarse en autoclave. Considere a los equipos y accesorios que han estado en contacto directo con las muestras como contaminados. Realice los procedimientos de limpieza que se recomiendan en los manuales de usuario correspondientes.
- Verifique que las tiras de reacción estén a la temperatura del laboratorio antes de retirarles la cubierta protectora.
- Utilice puntas limpias o nuevas para el trabajo con las soluciones y las muestras.
- No incorpore a los frascos originales remanentes de reactivos.
- Los sueros a utilizar deben ser preferentemente frescos, no inactivados por calor y sin precipitados. Debe evitarse la congelación y descongelación reiterada de las muestras.
- Verifique que las tiras de reacción estén niveladas en el soporte.
- Evite posibles contaminaciones con materiales fluorescentes.

- Verifique periódicamente la exactitud y precisión de las pipetas.

- Cumpla las normas de manipulación de los equipos utilizados y verifique previamente su adecuado funcionamiento, tenga especial cuidado en las operaciones de pipeteo y lavado.

- Si utiliza la multipipeta ERIZO para transferir los controles y las muestras, lave profusamente sus puntas para evitar la contaminación, al menos un lavado de 5 ciclos con solución de trabajo R1 y un lavado de 5 ciclos con agua destilada. Deseche la solución y el agua destilada después de cada lavado.

- Evite la exposición a la luz de los frascos que contienen el sustrato.

- El juego de reactivos no debe emplearse después de la fecha de vencimiento.

- Los reactivos del UMELISA HANSEN de lotes diferentes no se deben intercambiar.

PROCEDIMIENTO TÉCNICO

1.- Preparación de las muestras y controles.

Los controles se presentan en el estuche listos para usar.

Diluya las muestras 1:41 con la solución de trabajo R2 (5 µL de suero + 200 µL de la solución).

2.- Adición de las muestras y controles a las tiras de reacción.

Coloque 10 µL de las muestras previamente diluidas y de los controles sobre los pocillos de reacción, de acuerdo con el siguiente esquema de distribución:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	B	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	P	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

El Control Positivo (P) y el Control Negativo (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión. Como Blanco (B) utilice la solución R2 de trabajo.

Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA HANSEN para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.

3.- Incubación de las muestras y controles.

Incube las tiras de reacción durante 30 minutos a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

4.- Lavado.

Utilice un lavador de la tecnología SUMA. Lave las tiras de reacción cuatro veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo. La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

5.- Adición del conjugado.

Con una **punta nueva** extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras de reacción utilizadas y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de las tiras de reacción.

6.- Incubación del conjugado.

Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37 ºC en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

7.- Lavado.

Lave las tiras de reacción según se describe en el acápite 4.

8.- Adición del sustrato.

Coloque 10 µL de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de las tiras de reacción.

9.- Incubación del sustrato.

Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (de 20 a 25 ºC). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 60 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las variaciones de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

10.- Lectura.

Realice la lectura de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada determinación utilizando un lector de la serie SUMA.

La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMELISA HANSEN o pueden realizarse manualmente por el operador, siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

CONTROL DE LA CALIDAD

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

a) Al menos uno de los duplicados del Blanco (B1 o B2) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.

b) Al menos uno de los duplicados del Control Negativo (N1 o N2) debe presentar una fluorescencia que no supere en más de 10 unidades a la media del Blanco.

c) Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (P1 o P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60 y 180 unidades.

d) (NN-BB)/(P-BB) < 0,1

Donde:

NN: Valor promedio del Control Negativo.

BB: Valor promedio del Blanco.

P: Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo que se encuentre dentro de los límites de calidad.

NIVEL DE CORTE

Las muestras se consideran reactivas cuando:

$(Fi - BB)/(P - BB) \geq 0,300$

Fi= Fluorescencia de la muestra.

Las muestras se consideran en el umbral de reactividad (BL) cuando sus resultados se encuentran en una zona comprendida entre el nivel de corte y un 15% por debajo del mismo ("zona gris").

Una muestra será "BL" cuando:

$0,300 > (Fi - BB)/(P - BB) \geq 0,255$

Para definir de una forma rápida el nivel de corte y el límite inferior de la zona gris cuando no se dispone del programa automático, se calcula el valor de fluorescencia correspondiente para cada caso:

$F_{NC} = 0,300\ (P-BB) + BB$

$F_{BL} = 0,255\ (P-BB) + BB$

Donde:

F_{NC} = Valor de fluorescencia correspondiente al nivel de corte.

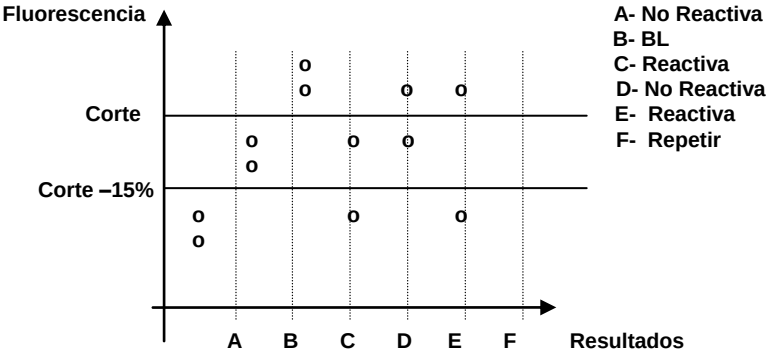
F_{BL} = Valor de fluorescencia correspondiente al límite inferior de la zona gris.

***** En zonas de alta prevalencia se recomienda un nivel de corte de 0,25.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

I-Muestras analizadas por duplicado:

La interpretación de los resultados se hará según el siguiente diagrama.



II-Muestras analizadas de forma simple:

-Si se obtienen valores menores que el límite inferior de la zona gris la muestra se considera no reactiva.

-Si una muestra presenta valores mayores o iguales que el nivel de corte se considera **"REACTIVA".**

-Si una muestra se encuentra en la zona gris (**"BL"**) se considera en el umbral de reactividad.

-Se recomienda que toda muestra con resultado **"REACTIVO"** ó **"BL"** se repita antes de realizar una interpretación, utilizando la fuente original.

Las muestras que hayan sido encontradas repetidamente reactivas o en el umbral de reactividad tienen una alta probabilidad de contener anticuerpos contra *M. leprae*, especialmente si provienen de una población con alto riesgo o si el valor obtenido es muy alto con respecto al nivel de corte.

Este ensayo ha sido diseñado para obtener una máxima sensibilidad. Ocasionalmente se pueden encontrar muestras que por sus características intrínsecas reaccionen inespecíficamente en el ensayo, por lo que toda muestra con resultado repetidamente **"BL"** o **"REACTIVO "** debe ser objeto de estudios confirmatorios por otro tipo de ensayos si se desea establecer con toda certeza la presencia de anticuerpos contra *M. leprae*.

BIBLIOGRAFÍA

1.Hunter, S.W., Brennan, P.J.:A novel phenolic glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. J Bacteriol. 147:728, 1981.

2.Brett, S.J. et al.:Use of synthetic and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. Clin Exp Immunol. 64:476, 1986.

3.González-Abreu, E. et al.:Comprobación serológica de la actividad de un antígeno del Mycobacterium leprae obtenido por síntesis química. Rev Cub Med Trop. 41:10, 1989.

4.Meeker, H.C. et al.:Sequential monitoring of leprosy patients with serum antibody levels to phenolic glycolipid-I, a synthetic analog of phenolic glycolipid-I and mycobacterial lipoarabinomanan. Int J Lep. 58:503-511, 1990.

5.Laferte, J. et al.:Ultramicroelisa para la detección de anticuerpos Anti M. leprae. Rev Inst Med trop. Sao Paulo 33: 491-495, 1991.

6.Bagshawe, A.F. et al.:IgM serum antibodies to phenolic glycolipid -I and clinical leprosy: two years' observation in a community with hiperendemic leprosy. Int J Lepr. 58:25-30, 1990.

7.Krishnamurty, P. et al.:Seroepidemiological study of leprosy in a highly endemic population of South India based on an ELISA using synthetic PGL-I. Int J Lep. 59:426-431, 1991.

8.Mora, N. et al.:Determinación de anticuerpos Anti-glicolípido fenólico-I en población general de un área endémica de lepra. Rev. de Leprología FONTILLES. XVIII:587-597, 1992.

9.Soebono, H. et al.:A seroepidemiological study of leprosy in high and low-

endemic Indonesian villages. Int J Lepr. 59:416- 425, 1991.

10.Batch, M.A. et al.:Antibodies to phenolic-glycolipid I and to whole Mycobacterium leprae in leprosy patients: evolution during therapy. Int J Lepr. 54:256, 1986.

11.Hussain, R. et al.:Quantitation of IgM antibodies to the M.leprae synthetic dissacharide can predict early bacterial multiplication in leprosy. Int J Lepr. 58:491-501, 1990.

12.Lefford, M.J. et al.:The value of IgM antibodies to PGL-I in the diagnosis of leprosy. Int J Lepr. 59:432-439, 1991.

13.Levis, W.R. et al.:IgM and IgG antibodies to phenolic- glicolipid I from Mycobacterium leprae in leprosy: insight into patients monitoring, erytheme nodosum leprosum and bacilary persistence. J Inv Dermatol. 86:529, 1986.

14.Saad, M. et al.:Use of the anti-PG-I antibody ELISA and the mitsuda reaction in early diagnosis of leprosy. Brazilian J Med Biol Res 24:801-805, 1991.

15.Shripad, A.P et al.:Screening of Anti-M.leprae antibodies in the blood samples eluted from filter paper blood blots. Int J Lepr. 58:123-126, 1990.

Noviembre 10, 2004

UMELISA HANSEN
Código UM 2008
Centro de Inmunoensayo. Calle 134 y Ave. 25, Apdo. Postal 6653, La Habana, Cuba. Teléfono: 208-2929, Fax: (537) 208-6514.