

APLICACION DEL METODO ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS MALARICOS EN DONANTES DE SANGRE¹

*Patricia Olaya de Morales,² Edgar Duque,³ Carlos A. Espinal²
y Patricia Guerra²*

INTRODUCCION

La transfusión sanguínea es un procedimiento de inmenso valor en la práctica médica actual, pero cuando se efectúa sin un control adecuado puede convertirse en un medio propicio para la transmisión de infecciones, sobre todo aquellas que se encuentran latentes en el donante.

Se han descrito casos de brucelosis (1), citomegalovirus (2) y otros excepcionales como aquel en que se demostró la presencia de microfilarias en sangre destinada a transfusión (3). Sin embargo, las enfermedades que se presentan con mayor frecuencia son la sífilis y la hepatitis B (4) y, en algunos países, la enfermedad de Chagas y la malaria (5).

Las pruebas rutinarias que se practican en la mayoría de los bancos de sangre para la selección de donantes incluyen la serología para la sífilis (VDRL) y la detección de antígeno asociado para la hepatitis B. El control de otras enferme-

dades infecciosas no es muy frecuente debido a la falta de conocimientos sobre el problema que representan. El establecimiento de métodos de control de agentes infecciosos en los bancos de sangre requiere de un estudio adecuado de las enfermedades prevalentes en las zonas geográficas de las que provienen la mayoría de los donantes, localizadas en las cercanías de los centros hospitalarios.

Se ha dado cuenta de malaria inducida por transfusión en países como los Estados Unidos de América o Francia (6, 7), donde la enfermedad es una infección excepcional, de baja incidencia y siempre importada. En México, donde hay algunas zonas de alta transmisión, se investigan los casos de malaria posteriores a transfusión (8). En países como Colombia, donde la malaria es endémica, los casos inducidos por transfusión pueden confundirse fácilmente con infecciones adquiridas a través del vector; algunos casos no se detectan en el hospital en que se efectuó la transfusión y la mayoría simplemente no se informa. Esta falta de registro de datos y estudios al respecto hace

¹ Este estudio se realizó con fondos provenientes del contrato INS/AIBS/AID DPE 0453-C-00-2009-00(01) y del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, Colombia.

² Instituto Nacional de Salud, Grupo de Malaria. Dirección postal: Apartados aéreos 80080 y 80334, Bogotá, Colombia.

³ Hospital Universitario del Valle, Cali, Colombia.

imposible precisar la incidencia de la malaria por transfusión en Colombia.

Se ha demostrado que el examen de sangre periférica por la técnica de gota gruesa no es un método práctico para la selección de donantes de sangre (9). La serología permite detectar las infecciones activas y pasadas, y ha demostrado su utilidad para el estudio de la malaria inducida por transfusión, mediante la técnica de inmunofluorescencia (10) y por otro procedimiento, la prueba de inmunoadsorción enzimática (ELISA) (11).

En este artículo se informa sobre una investigación serológica que se llevó a cabo entre los donantes del banco de sangre del Hospital Universitario de Cali, Colombia, con el fin de evaluar el riesgo de malaria inducida por transfusión.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se llevó a cabo en la ciudad de Cali, capital del departamento del Valle, en el occidente de Colombia. Si bien en la zona urbana no hay transmisión de malaria esta se presenta en las zonas vecinas, desde donde hay una gran migración de la población hacia la ciudad. Estudios realizados por el Servicio Nacional de Erradicación de la Malaria (SNEM) revelaron que en 1983 en el departamento del Valle se detectaron seis focos y 12 210 casos de malaria (comunicación del SNEM).

Durante tres meses, del 15 de septiembre al 15 de diciembre de 1983, se tomaron muestras a todos los donantes del banco de sangre del Hospital Universitario del Valle. Los sueros se separaron, se congelaron y se enviaron al Laboratorio de Malaria del Instituto Nacional de Salud de Bogotá. De todos los donantes se

obtuvieron datos sobre edad, sexo, grupo sanguíneo y Rh, además de su procedencia o permanencia previa en otras zonas diferentes de la ciudad de Cali.

Los niveles de anticuerpos antimaláricos se determinaron en todas las muestras por duplicado utilizando el método ELISA indirecto desarrollado por Voller *et al.* (12), con las modificaciones que se especifican a continuación. El antígeno fue un extracto de formas maduras de la cepa FCB-2 de *Plasmodium falciparum* (13) obtenidas por concentración con gradientes de Percoll (14) sonificadas durante 45 segundos a 60 ciclos por segundo. El período de incubación del antígeno fue de 1 a 2 días a 4 °C, y el de los sueros de 1 hora 30 minutos. El conjugado (anti-IgG humana FAB-2 en cabra y ligada a fosfatasa alcalina producida en el Instituto Nacional de Salud) se incubó durante 2 horas, y el sustrato (p-nitrofenilfosfato sigma) se dejó reaccionar durante 30 minutos. Estas incubaciones se realizaron a una temperatura de 22 ± 2 °C.

Las muestras de sueros se diluyeron 1/300; en cada microplaca se incluyó un testigo positivo (suero conocido de enfermos de malaria), uno negativo (conjunto de sueros de individuos sin antecedentes de malaria) y otro de PBS (pH 7,4) para diluir el suero.

Después de efectuar la prueba, las densidades ópticas obtenidas se registraron en un fotómetro para micro ELISA (ELISA—reader de Dynatech). En estudios anteriores se estableció la densidad óptica límite entre el valor negativo y el positivo, que fue de 0,2 (11).

RESULTADOS

Durante los tres meses del estudio se analizaron 1 859 muestras. La positividad total para anticuerpos antimaláricos que se encontró por el método ELISA fue de 13,4 por 1 000. Entre los donantes que en el interrogatorio inicial afirmaron que habían permanecido en otras localidades diferentes de Cali la positividad fue de 29,8 por 1 000, mientras que entre los de Cali fue de 9,4 por 1 000 (cuadro 1).

Se encontró una relación entre la procedencia de los donantes y su seropositividad; de los 11 donantes positivos por el método ELISA procedentes de otras localidades distintas de Cali, ocho provenían de zonas donde se ha demostrado la transmisión de la malaria, pues hay casos autóctonos; tres donantes procedían de zonas en las que se habían informado casos de malaria, aunque no se tiene certeza de que estos sean autóctonos. Por el método ELISA no se encontraron donantes positivos entre los provenientes de zonas donde no hay transmisión de malaria ni de zonas de las cuales se desconoce la situación con respecto a la enfermedad.

En el cuadro 2 se presentan los valores positivos por el método ELISA para anticuerpos antimaláricos. Las características de los receptores de sangre de donantes positivos por el método ELISA se

CUADRO 1. Prueba de anticuerpos antimaláricos por el método ELISA, según procedencia de los donantes, Cali, Colombia, 1983

Procedencia	No. de donantes	Positivos (por 1 000)
Cali	1 484	9,4
Otras localidades	369	29,8
Sin información	6	—
Total	1 859	13,4

CUADRO 2. Resultado de la prueba de anticuerpos antimaláricos en 1 859 muestras de sangre (valores de ELISA), Cali, Colombia, 1983

No. de muestras	Densidad óptica (405 nm)	\bar{X}	Desviación estándar
1 834	< 0,20	0,075	0,043
14	0,20-0,29	0,28	0,017
8	0,30-0,39	0,34	0,019
3	> 0,40	0,57	0,107

observan en el cuadro 3. No fue posible obtener datos de los otros receptores. El intervalo entre la transfusión de la sangre y la salida del hospital en muchas ocasiones fue menor que el tiempo mínimo requerido para la manifestación de cualquiera de las especies de *Plasmodium*.

DISCUSION

En los Estados Unidos se ha informado un riesgo de 0,25 casos por millón de unidades transfundidas (6). En este país el riesgo de contraer malaria por transfusión es muy bajo y se atribuye a donantes que emigraron de regiones donde se presenta la enfermedad, o pertenecientes a las fuerzas armadas y que adquirieron la infección en zonas endémicas de algún otro país. En México muchos casos, especialmente producidos por *Plasmodium malariae*, se deben a transfusiones sanguíneas. En este país entre 1967 y 1970 se informó una incidencia de 0,13 casos por 1 000 entre donantes voluntarios, y entre 1968 y 1969 de 3 casos por 1 000 entre donantes que recibieron una paga por su sangre (15).

La proporción de 13,4 por 1 000 donantes positivos para anticuerpos antimaláricos que se encontró en este

CUADRO 3. Características de los receptores de unidades^a positivas por el método ELISA, Cali, Colombia, 1983

Receptor (No.)	Intervalo transfusión-alta (días)	Transfusión	Densidad óptica por unidad transfundida
1	5	Sangre total	0,24
2	32	Sangre total	0,31
3	28	Plasma ^b	0,29
4	6	Glóbulos rojos ^b	0,29
5	20	Sangre total	0,25
6	1	Glóbulos rojos	0,45
7	57	Glóbulos rojos	0,25
8	4	Plasma	0,31
9	3	Glóbulos rojos	0,35
10	11	Glóbulos rojos	0,29
11	8	Sangre total	0,29
12	63	Sangre total	0,71
13	33	Glóbulos rojos	0,28
14	10	Sangre total	0,28
15	12	Sangre total	0,35 ^c
16	11	Sangre total	0,27

^a Unidad, cantidad de sangre donada por un individuo, generalmente 250 ml.

^b De un solo donante.

^c Se comprobó malaria por *P. vivax* dos meses antes de la donación

estudio es alta y supera la de 8,6 por 1 000 hallada en el Hospital Militar Central de Bogotá (11). Esto sugiere que existe un alto riesgo de inducción de malaria por transfusión en el Hospital Universitario del Valle. Como era de esperar, la mayor proporción de casos positivos por serología corresponde a donantes de zonas consideradas endémicas. Además, algunos de los casos positivos provenientes de la ciudad podrían atribuirse a la permanencia temporal de los donantes en zonas maláricas, la que no se comunicó durante el interrogatorio. Dicha omisión, así como la de manifestaciones previas de síntomas compatibles con la enfermedad suele ser involuntaria,

con excepción de los casos en los que se recibe dinero por la sangre donada.

De una unidad de sangre es posible obtener varios productos que induzcan malaria por transfusión a más de un receptor. Se han informado casos inducidos por la aplicación de glóbulos rojos concentrados (16), plasma rico en plaquetas (17), concentrado de leucocitos (18), así como dos casos de infección con una unidad de sangre (19). En consecuencia, el riesgo de inducción de la enfermedad puede ser mayor que el estimado según el número de donantes.

En aquellos bancos de sangre que, como el de Cali, se encuentran en una zona donde no hay transmisión de la malaria, se recomienda establecer un control adecuado mediante la serología, pues la enfermedad puede presentarse por la transfusión de sangre de donantes provenientes de zonas endémicas ccr-

canas a pacientes receptores no inmunes. Por el contrario, en bancos de sangre pequeños localizados en las zonas endémicas, una prueba de anticuerpos a los donantes sería de poca utilidad debido a la alta positividad serológica.

Es necesario señalar que en Colombia existen las tres especies de *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. vivax* y, en muy baja proporción, *P. malariae*. Aunque se conoce la reacción cruzada de anticuerpos entre especies de *Plasmodium*, el valor obtenido siempre es más bajo con la especie heteróloga y, en ocasiones, puede ser negativo y provocar la obtención de resultados falsos negativos de *P. vivax* o *P. malariae*.

Se han observado valores de ELISA negativos en niños con malaria comprobada parasitológicamente (20) así como con parasitemias muy altas (Groot *et al.*, resultados inéditos). Por el contrario, la prueba de inmunofluorescencia indirecta en esos casos por lo común es positiva. Ya que los donantes de sangre deben ser mayores de 15 años, y cuando son portadores de malaria son asintomáticos y con parasitemias muy bajas (4), en ellos la utilización del método ELISA resulta adecuada.

No es fácil precisar los casos de malaria inducida por transfusión, pues muchos de los pacientes receptores de sangre o sus componentes también reciben antibióticos que pueden afectar al parásito. De acuerdo con la sensibilidad del parásito, el antibiótico puede curar la infección malarica o, simplemente, atenuarla retardando la aparición de los síntomas clínicos.

Cuando la malaria se induce por transfusión sanguínea se ha observado que el período previo a la aparición de la parasitemia es de $10,5 \pm 4,9$ días para *P. falciparum*, de $16,6 \pm 8,2$ días para *P. vivax* y de $41,1 \pm 21,3$ días para *P. malariae* (21). A muchos pacientes se les da de alta antes del período mínimo

de manifestación de la parasitemia (véase el cuadro 3), lo que hace posible que presenten el cuadro clínico de malaria más tarde y este no se asocie con la transfusión.

El alto riesgo de malaria inducida por transfusión en países donde la enfermedad es endémica hace indispensable que los bancos de sangre establezcan mecanismos suficientemente confiables para asegurar un control adecuado de esta vía de infección.

RESUMEN

Con el fin de evaluar el riesgo de malaria inducida por transfusión, en la ciudad de Cali, Colombia, de septiembre a diciembre de 1983 se llevó a cabo un estudio serológico entre los donantes del banco de sangre del Hospital Universitario del Valle. Para ello se determinaron los niveles de anticuerpos antimaláricos mediante la prueba de inmunoadsorción enzimática (ELISA), utilizando como antígeno un extracto soluble de la cepa FCB-2 de *P. falciparum*. La proporción más alta de muestras positivas por el método ELISA se manifestó entre los donantes que provenían de zonas endémicas vecinas. En total se encontró una positividad de 13,4 por 1 000, lo cual indica un alto riesgo de malaria inducida por transfusión. Los resultados revelan la necesidad de establecer métodos confiables para la selección de la sangre en los centros hospitalarios donde concurren donantes que residen en zonas endémicas. □

AGRADECIMIENTO

Los autores desean expresar su agradecimiento al personal del banco de sangre del Hospital Universitario del Valle por su colaboración en la recolección y envío de muestras, y a la señora Diana Estupiñán por su asesoría en la parte de estadística.

REFERENCIAS

- 1 Wood, E. E. Brucellosis as a hazard of blood transfusion. *Br Med J* 1(4904):27-28, 1955.
- 2 Lamberson, H, Mc Millan, J., Weiner, L., Williams, M., Clark, D., Mc Mahon, C., Bousman, E. y Patti, A. T. Nursery acquired cytomegalovirus (CMV) infection. *Transfusion* 23(5) [Abst S 46]:418, 1983.
- 3 Bird, G. W. G. y Menon, K. K. Survival of *Microfilaria bancrofti* in stored blood. *Lancet* 2(7204):721, 1961.
- 4 Bruce-Chawatt, L. J. Blood transfusion and tropical disease. *Trop Dis Bull* 69(9):825-861, 1972.
- 5 Sagua, H., Araya, J., González, J. y Fuentes, A. Seropositividad chagásica en banco de sangre de zona endémica. Algunos aspectos epidemiológicos de los donantes. *Bol Chil Parasitol* 37(1-2):24-26, 1982.
- 6 Guerrero, I. C., Weniger, B. C. y Schultz, M. G. Transfusion malaria in the United States, 1972-1981. *Ann Intern Med* 99(2):221-226, 1983.
- 7 Ranque, J. Le paludisme post-transfusionnel. État actuel de la question. *Rev Fr Transfus Immunohematol* 24(2):234-242, 1981.
- 8 Vargas, L. Notas sobre la transfusión sanguínea y el paludismo inducido en México. *Salud Publica Mex* 24(3):353-363, 1972.
- 9 Grant, D. B., Perinpanayagam, M. S., Shute, P. G. y Zeitlin, R. A. A case of malignant tertian (*Plasmodium falciparum*) malaria after blood transfusion. *Lancet* 2(7148):469-470, 1960.
- 10 Sulzer, A. J. y Wilson, M. The indirect fluorescent antibody test for the detection of occult malaria in blood donors. *Bull WHO* 45(3):375-379, 1972.
- 11 Olaya de Morales, P. y Espinal, C. A. Detección de anticuerpos antiplasmodium por ELISA en donantes de sangre. *Biomedica* 2(2):57-62, 1982.
- 12 Voller, A., Huldt, G., Thors, C. y Engvall, E. New serological test for malaria antibodies. *Br Med J* 1(5959):659-661, 1975.
- 13 Espinal, C. A., Moreno, E., Guerra, P. y De la Vega, P. Aislamiento y caracterización de cepas colombianas de *P. falciparum*. *Biomedica* 2(3):118-128, 1982.
- 14 Rivadeneira, E., Wasserman, M. y Espinal, C. A. Separation and concentration of the schizonts of *Plasmodium falciparum* by Percoll gradients. *J Protozool* 30(2):367-370, 1983.
- 15 Sánchez Medal, L. La transfusión sanguínea. *Gac Med Mex* 102(5):123-124, 1971.
- 16 Epidemiologic notes and reports. Transfusion malaria, serologic identification of infected donors. *MMWR* 32(17):222-229, 1983.
- 17 Garfield, M. D., Eshler, W. B. y Maki, D. G. Malaria transmission by platelet concentrate transfusion. *JAMA* 240(21):2885-2886, 1978.
- 18 Dover, A. S. y Guinee, V. F. Malaria transmission by leucocyte component therapy. *JAMA* 217(2):1701-1702, 1971.
- 19 Espinal, C. A. y Olaya de Morales, P. Indirect ELISA test for malaria in blood donors. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 78(5):645-647, 1984.
- 20 Spencer, H. C., Collins, W. E., Warren, Mc. W., Jefferey, G. M., Mason, J., Huong, A. Y., Stanfill, P. S. y Skinner, J. C. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for malaria. III. Antibody response in documented *P. falciparum* infections. *Am J Trop Med Hyg* 30(4):747-750, 1981.
- 21 Bruce-Chwatt, L. J. Transfusion malaria. *Bull WHO* 50(3-4):337-346, 1974.

SUMMARY

THE ELISA METHOD FOR THE DETECTION OF MALARIA ANTIBODIES IN BLOOD DONORS

To evaluate the risk of transfusion-induced malaria, in the city of Cali, Colombia, a serologic study was carried out from September to December 1983 among the donors of the blood bank in the Hospital Universitario del Valle. Malaria antibody levels were determined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using a soluble extract of *P. falciparum* strain FCB-2 as antigen. The highest proportion of positive specimens by the ELISA method was found among donors from neighboring endemic areas. The overall positivity rate found was 13,4 per 1 000, which points to a high risk of transfusion-induced malaria. The results reveal a need to establish reliable methods in hospital facilities for the selection of blood supplied by donors residing in endemic areas.

RESUMO

APLICAÇÃO DO MÉTODO ELISA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS MALÁRICOS EM DOADORES DE SANGUE

A fim de avaliar o risco de malária induzida por transfusão, de setembro a dezembro de 1983 realizou-se na cidade de Cali, Colômbia, um estudo serológico entre os doadores do banco de sangue do Hospital

Universitario del Valle. Para isso, foram determinados os níveis de anticorpos antimaláricos utilizando a prova de imunossorção enzimática (ELISA), empregando como antígeno um extrato solúvel da cepa FCB-2 de *P. falciparum*. Manifestou-se a mais alta proporção de amostras positivas pelo método ELISA entre os doadores provenientes de zonas endêmicas vizinhas. Encontrou-se, no total, uma positividade de 13,4 por 1 000, o que indica alto risco de malária induzida por transfusão. Os resultados mostram a necessidade de estabelecer métodos confiáveis de seleção de sangue nos centros hospitalares aos quais afluem doadores residentes em zonas endêmicas.

RÉSUMÉ

APPLICATION DE LA MÉTHODE ELISA POUR LE DÉPISTAGE D'ANTICORPS DU PALUDISME CHEZ LES DONNEURS DE SANG

Afin d'évaluer le risque de paludisme associé aux transfusions sanguines, dans la période allant de septembre à décembre 1983 on a effectué une étude sérologique parmi les donneurs de la banque du sang de l'Hospital Universitario del Valle de la ville de Cali, en Colombie. Pour cela, on a déterminé les niveaux d'anticorps antipaludéens par l'épreuve de titrage immuno-enzymatique (ELISA), en utilisant comme antigène un extrait soluble de la souche FCB-2 de *P. falciparum*. La proportion la plus forte d'échantillons positifs par la méthode ELISA a été relevée parmi les donneurs en provenance de zones endémiques des alentours. On a trouvé dans l'ensemble une positivité de 13,4 par 1 000, ce qui indique un haut risque de paludisme généré par transfusion. Les résultats montrent la nécessité d'établir des méthodes fiables pour la sélection du sang dans les centres hospitaliers où se présentent des donneurs qui résident dans des zones endémiques.