

ULTRAMICROELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM ANTI *M. leprae*

José LAFERTE(1), Elba G. ABREU(1), René ROBAINA(2) & Vicente VEREZ(3)

RESUMEN

La disponibilidad del sistema Ultramicroanalítico (SUMA) y de un antígeno especie-específico del *M. leprae* obtenido mediante síntesis química, permitió la normalización y validación de un ultramicroELISA para la detección de anticuerpos IgM específicos a esta micobacteria. El análisis de 433 sueros de banco de sangre y 265 sueros usados para validar el método y clasificados en un grupo control de donantes de banco de sangre (100), un grupo de pacientes tuberculosos (50), un grupo de enfermos de lepra (65) y un grupo de contactos de estos enfermos (50), mostró la especificidad del ensayo para evidenciar la infección con el *M. leprae*.

Los resultados obtenidos del estudio adicional de 140 muestras de suero de contactos de enfermos estuvieron estrechamente correlacionados ($r = 0,98$) con los resultados obtenidos por la técnica de microELISA convencional.

La utilización del SUMA no solo permite un notable ahorro de reactivos si no además facilita la lectura, cálculo, validación y almacenamiento automático de los resultados.

UNITERMOS: UltramicroELISA

INTRODUCCION

La lepra es una infección crónica causada por un parásito intracelular obligado: el *Mycobacterium leprae*, esto determina que los mecanismos de defensa en las personas infectadas sean fundamentalmente de tipo celular y no de tipo humoral. A pesar de esto se ha observado una correspondencia entre la carga bacilar y el nivel de anticuerpos presentes en un individuo infectado, detectándose generalmente niveles considerables de anticuerpos en las formas multibacilares de la enfermedad y niveles más bajos en las formas paucibacilares¹⁴.

Estudios realizados recientemente han demostrado la validez de los ensayos dirigidos a detectar anticuerpos específicos al *M. leprae*, lo que representa una valiosa ayuda en la identificación temprana de personas infectadas, en alto riesgo de enfermar y quizás también de individuos infectados que aún no presentan signos clínicos y constituyen

diseminadores silenciosos de la enfermedad. La localización precoz de estos individuos es importante para lograr el corte de la cadena de transmisión^{5,6}. Una contribución importante a la realización práctica de estos ensayos lo constituyó el aislamiento y la caracterización de un antígeno especie-específico del *M. leprae*: el glicolípido fenólico I^{11,12} cuya utilización en la técnica de ELISA demostró la presencia de anticuerpos (fundamentalmente de tipo IgM) al mismo en pacientes con lepra^{1,7,15,16}.

El análisis de los determinantes antigénicos de este glicolípido utilizando anticuerpos poli y monoclonales, mostró la inmunodominancia del residuo terminal^{3,6} di-o-metil glucosa^{11,17} y estos elementos sirvieron de base para la elaboración de antígenos sintéticos, los cuales acoplados a una proteína portadora (seroalbúmina bovina) ofrecieron similares resultados que con el antígeno natu-

(1) Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apdo. 601 Siboney, Ciudad Habana, Cuba.

(2) Centro de Inmunoensayo. Apdo. 6945. Ciudad Habana, Cuba.

(3) Laboratorio de Química de los Carbohidratos. Universidad de la Habana. Facultad de Química. Ciudad Habana, Cuba.

Dirección para correspondencia: Lic. José Laferté. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apdo. 601. Siboney, Ciudad de la Habana, Cuba.

ral en la técnica de microELISA^{4,8,9,10,13}.

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en la normalización y validación de un ultramicroelisa para la detección de anticuerpos IgM específicos al *M. leprae*, que puede constituir una valiosa ayuda para el pesquisaje masivo en las áreas endémicas y como instrumento para el control de la enfermedad.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Antígeno. Fue obtenido sintéticamente¹³ y donado por el laboratorio de química de los carbohidratos de la Universidad de la Habana, Cuba.

Conjugado. Para su preparación se utilizó un antisuero, anti IgM humana monoespecífico que fue donado por el Centro de inmunoensayo Ciudad de la Habana, Cuba. La fracción IgG de este antisuero se obtuvo mediante un proceso de purificación de la fracción gamma obtenida por precipitación salina y fue entonces utilizada para la conjugación con la enzima beta galactosidasa recombinante de *E. coli*, según el método del glutaraldehído en un paso². Esta enzima fue suministrada por el centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Ciudad de la Habana, Cuba.

Sustrato

Se utilizó el 4 metilumbelliferyl beta D galactopiranosido (sustrato fluorigénico) que fue suministrado por el laboratorio de química de los Carbohidratos de la Universidad de la Habana, Cuba. Como solución fluorescente de referencia se empleó la 4 metilumbelliferona obtenida de la Koch Light Limited, Harvehill, Suffolk, England.

Los demás reactivos químicos empleados en las soluciones tampón comunes fueron de la BDH.

Muestras

Se procesaron un total de 838 muestras de sueros, el grupo control (533 sueros) fue obtenido de donantes de un banco de sangre de Ciudad de la Habana. Los sueros del grupo de pacientes tuberculosos (50) fueron obtenidos en el hospital

antituberculoso de Ciudad de la Habana, los sueros de enfermos de lepra (65) y de contactos de enfermos (190) fueron donados por el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" y el Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de Guantánamo, Cuba.

Equipos

Fue utilizado un equipo SUMA modelo 121-B consistente en un espectrofluorímetro-nefelómetro automático acoplado a una microcomputadora y una multipipeta de 96 posiciones computarizada (ERIZO 101). Se utilizaron además otros accesorios específicos para el procesamiento de muestras y reactivos en el rango ultramicroanalítico. Centro de Inmunoensayo. Ciudad de la Habana, Cuba.

UltramicroELISA

Las placas PVC-SUMA de 96 cavidades fueron sensibilizadas con el antígeno a una concentración de 2 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato pH 9.6. La conservación de las mismas se realizó a 4°C hasta el momento de su utilización.

Las muestras y sueros controles se diluyeron 1:100 en tampón TRIS-Tween (TRIS-T) 15 mM, conteniendo suero de carnero al 5%, se distribuyeron a razón de 10 microlitros por cavidad en la placa de reacción con el empleo de la multipipeta ERIZO 101 y se realizó la incubación durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda. Al término de este tiempo se procedió a realizar el lavado con tampón TRIS-T 15 mM y posteriormente se adicionó el conjugado anti IgM humana betagalactosidasa, diluido 1:1600 en tampón TRIS-T 15 mM, conteniendo suero de carnero al 5%, se realizó la incubación durante 1 hora a 37°C y posteriormente el lavado en las mismas condiciones anteriormente descritas.

Con la ayuda de la multipipeta de 96 posiciones se dispensaron 10 microlitros de la solución de sustrato por cada cavidad de las placas de reacción y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. La fluorescencia resultante fue estimada en el espectrofluorímetro automático SUMA 121 y los resultados fueron expresados por la relación (F-B)/(P-B), donde:

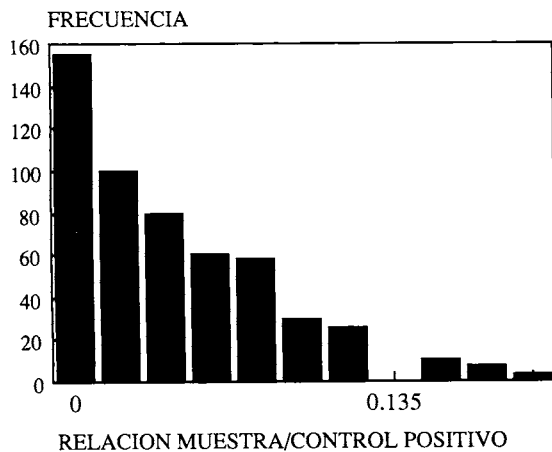
F: unidades de fluorescencia de la muestra.

P: unidades de fluorescencia del control positivo.

B: unidades de fluorescencia del blanco.

El criterio de seropositividad fue determinado previamente sobre la distribución de una población sana, sin contacto conocido con el *M. leprae*, utilizando el criterio del 98 percentil recomendado por la OMS. Los resultados obtenidos en la evaluación de la respuesta analítica de 433 muestras de suero de esta población, se ilustran en la Figura 1. Se seleccionó 0.135 como criterio de seropositividad del ensayo.

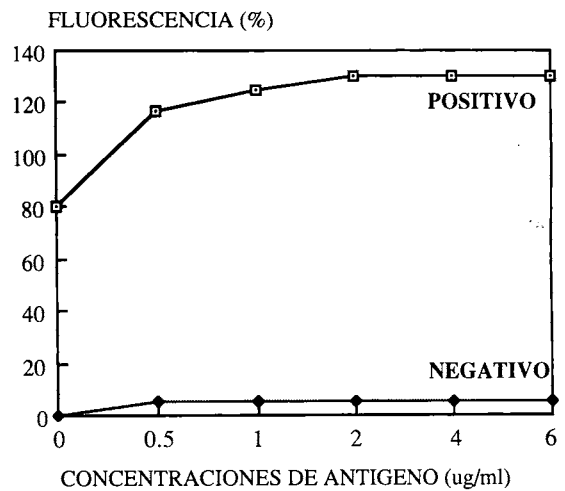
Figura 1. Frecuencia de distribución de las respuestas analíticas en 433 muestras de suero de una población normal. Se seleccionó 0.135 como criterio de seropositividad del ensayo (98 percentil).



RESULTADOS Y DISCUSION

Las concentraciones de los reactivos y las condiciones de la reacción fueron determinadas mediante titulación cruzada, seleccionándose aquellas que dieron los mejores resultados en el ensayo (Figuras 2-4). Para cada caso (antígeno de recubrimiento, dilución del suero y dilución del conjugado) se escogió aquel punto en la curva de titulación donde la relación positivo-negativo fue superior a 10 y el nivel de fondo fue bajo. En el caso particular del antígeno de recubrimiento se seleccionó la concentración de 2 µg/ml como la adecuada para el trabajo la cual corresponde al punto mínimo de saturación en la curva de titulación (Figura 2).

Figura 2. Titulación del antígeno de recubrimiento. Se seleccionó la concentración de 2 microgramos por mililitro como la óptima para la sensibilización de las ultramicroplacas.



Las placas de reacción sensibilizadas en estas condiciones fueron estables a 4°C durante un periodo de 12 meses, lo cual significó no solo un ahorro de tiempo y reactivos, sino además una disminución de la variabilidad de la técnica por este concepto.

Solo un 2% de los individuos del grupo control presentaron una respuesta que excedió al límite normal establecido para el ensayo (Tabla 1). A diferencia de esto los porcentajes obtenidos en el grupo de enfermos fueron muy superiores, específicamente en el grupo afectado con las formas multibacilares de la enfermedad (93%). En este grupo generalmente se detectan niveles elevados de anticuerpos IgM específicos al *M. leprae*¹⁶.

TABLA 1.

Resultados obtenidos en la detección de anticuerpos IgM al *M. leprae* en grupo de sueros mediante el ensayo de ultramicroELISA.

	Nº	>0.135	%
CONTROLES	100	2	2
TUBERCULOSOS	50	0	0
CONTACTOS	50	12	24
LEPRA PAUCIBACILAR	25	8	32
LEPRA MULTIBACILAR	40	37	93

No se observó reactividad cruzada en ninguno de los 50 sueros de pacientes tuberculosos ensaya-

Figura 3. Curvas de titulación de los sueros controles. La dilución 1:100 fue seleccionada para las muestras.

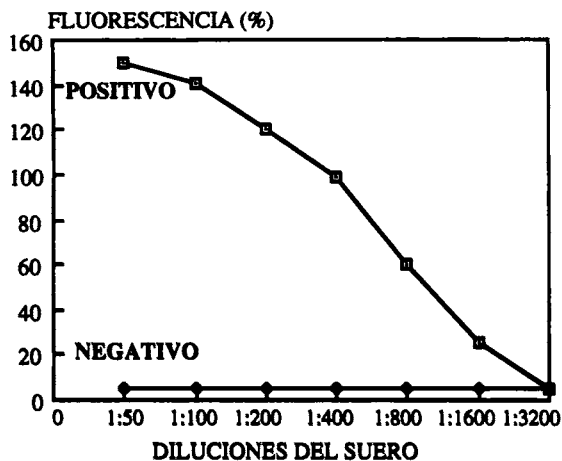
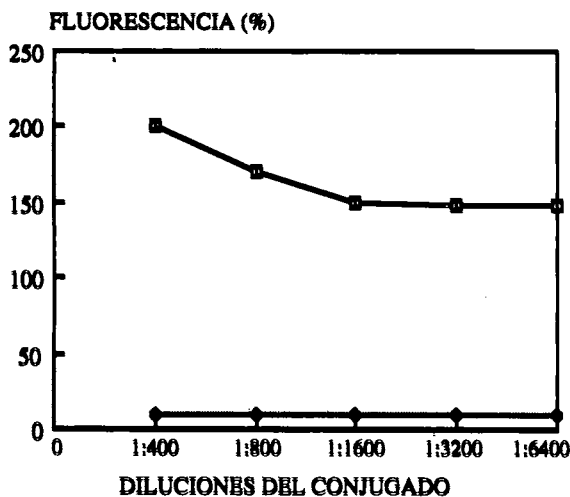


Figura 4. Curvas de titulación del conjugado anti IgM humana Bgalactosidasa. La dilución 1:1600 fue seleccionada para el ensayo.

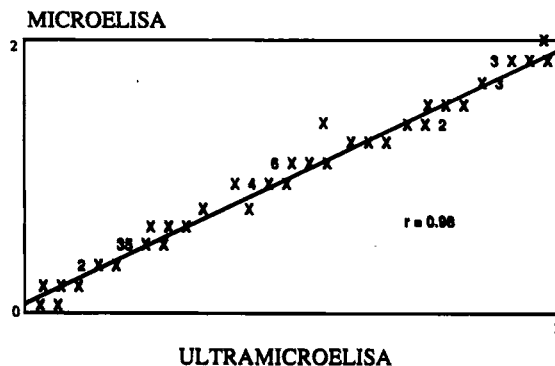


dos y el estudio de un grupo de contactos de enfermos de lepra reveló la presencia de anticuerpos IgM anti *M. leprae* en un nivel superior al grupo control. Esto podría ser de utilidad para la identificación de individuos presumiblemente infectados y con riesgo de enfermar en las áreas endémicas.

Las respuestas de 140 muestras de suero de contactos de enfermos de lepra, procesados paralelamente por microELISA y ultramicroELISA (Figura 5) mostraron un alto grado de correspondencia entre los resultados ($r = 0,98$).

Estudios posteriores podrían igualmente valorar la utilidad práctica de esta técnica en el monitoreo de pacientes bajo tratamiento, lo cual ha sido reportado para el sistema microELISA del mismo principio³.

Figura 5. Correlación del microELISA y del ultramicroELISA en la detección de anticuerpos IgM al *M. leprae* en 140 muestras de suero de contactos de enfermos.



El Sistema Ultramicroanalítico (SUMA) ha sido usado con éxito en diferentes programas de control en Cuba (alfafetoproteína, hipotiroidismo congénito, detección de anticuerpos al virus de la inmunodeficiencia humana, detección del antígeno carcinoembrionario, detección del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, etc), siendo adecuado para el procesamiento de un gran número de muestras y empleando solo de 5 a 10 microlitros como volumen de reacción. Se obtiene además un incremento de la sensibilidad debido al uso de un sustrato fluorogénico y la utilización de una microcomputadora acoplada al espectrofluorímetro facilita el procedimiento de lectura, cálculo, validación y almacenamiento automático de los resultados.

La utilización de esta tecnología unida al empleo de la enzima betagalactosidasa aportan aspectos novedosos a los ensayos serológicos relacionados con el *M. leprae* permitiendo además disponer de un sistema rápido y económico para emprender estudios masivos en las áreas endémicas.

SUMMARY

UltramicroELISA Assay for the Detection of Human IgM Antibodies to *M. leprae*.

The availability of an ultramicroanalytic system (SUMA) and specie-specific antigen of *M.*

leprae obtained by chemical synthesis, have made possible the standardization and validation of an ultramicroELISA assay for detecting specific human IgM antibodies to this mycobacterium. The specificity of this test to demonstrate the infection with *M. leprae* was corroborated through a screening of 433 blood bank serum samples and other 265 from different groups (100, control group, 50 tuberculosis patients, 65 leprosy patients, 50 from household). The results obtained in the additional study of 140 household sero showed a high correlation ($r = 0.98$) with the conventional microELISA method. The use of SUMA allows saving reagents and time since sample handling, plate reading, print out and storing the data are computer assisted.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AGUADO SANCHEZ, G.; MALIK, A.; TOUGNE, C.; LAMBERT, P.H. & ENGERS, H.D. - Simplification and standardization of serodiagnostic tests for leprosy based on Phenolic Glycolipid-I (GP-I) antigen. Symposium on the immunology of leprosy. *Leprosy Rev.*, 57 (Suppl. 2): 83-93, 1986.
2. AVRAMEAS, J. - Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. *Immunochemistry*, 6: 43-52, 1969.
3. BACH, M.A.; WALLACH, D.; FLAGEUL, B.; HOFFENBACH, A. & COTTENOT, F. - Antibodies to phenolic glycolipid - I and to whole *Mycobacterium leprae* in leprosy patients: evolution during therapy. *Int. J. Leprosy*, 54: 256-267, 1986.
4. BRETT, S.J.; PAYNE, S.N.; GIGG, J.; BURGESS, P. & GIGG, R. - Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. *Clin. exp. Immunol.*, 64: 476-483, 1986.
5. ABE, M.; MINAGAWA, F.; YOSHINO, Y.; OZAWA, T.; SAIKAWA, K. & SAITO, T. - Fluorescent Leprosy Antibody Absorption (FLA-ABS) Test for Detecting Subclinical Infection with *Mycobacterium leprae*. *J. Int. Leprosy*, 48: 109-119, 1980.
6. BUCHANAN, T.M.; YOUNG, D.B.; MILLER, R.A. & KHANOLKAR, S.R. - Serodiagnosis of infection with *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Leprosy*, 51: 524-530, 1983.
7. CHO, S.N.; YANAGIHARA, D.L.; HUNTER, S.W.; GELBER, R.H. & BRENNAN, P.J. - Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.*, 41: 1077-1083, 1983.
8. CHO, S.N.; FUJIWARA, T.; HUNTER, S.W.; REA, T.H.; GELBER, R.H. & BRENNAN, P.J. - Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl-B-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. *J. infect. Dis.*, 150: 311-322, 1984.
9. FUJIWARA, T.; HUNTER, S.W.; CHO, S.N.; ASPINALL, G.O. & BRENNAN, P.J. - Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect. Immun.*, 43: 245-252, 1984.
10. GIGG, J.; GIGG, R.; PAYNE, S. & CONANT, R. - The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17* synthesis of propyl-O-(3,6-Di-O-methyl-B-D-glucopyranosyl)-(1 → 4)-O-(2,3-Di-O-Methyl- α -L-rhamanopyranosyl)-(1 → 2)-3-O-methyl-L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of the major serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. *Chem. Phys. Lip.*, 38: 299, 1985.
11. HUNTER, S.W. & BRENNAN, P.J. - A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bact.*, 147: 728-735, 1981.
12. HUNTER, S.W.; FUJIWARA, T. & BRENNAN, P.J. - Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *J. Biol. Chem.*, 257: 15072-15078, 1982.
13. MARIÑO, J.R.; BENCOMO, V.V.; GONZALEZ, L. & PEREZ, C.S. - Synthesis of allyl and benzyl 4-O (3,6 di-O-methyl-8-D) glucopyranosyl 1-2, 3-Di-O methyl-L rhamnopyranoside. *Carbohydr. Res.*, 165: 197-206, 1987.
14. SANSONETTI, P.H. & LAGRANGE, P.H. - The immunology of leprosy: speculations on the leprosy spectrum. *Rev. infect. Dis.*, 3: 422-469, 1981.
15. YOUNG, D.B. & BUCHANAN, T.M. - A serological test for leprosy with a glycolipid specific for *Mycobacterium leprae*. *Science*, 221: 1057-1059, 1983.
16. YOUNG, D.B.; DISSANAYAKE, S.; MILLER, R.A.; KHANOLKAR, S.R. & BUCHANAN, T.M. - Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the specie-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *J. infect. Dis.*, 149: 870-873, 1984.
17. YOUNG, D.B.; KHANOLKAR, S.R.; BARG, L.L. & BUCHANAN, T.M. - Generation and characterization of monoclonal antibodies to the phenolic glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.*, 43: 183-188, 1984.

Recebido para publicação em 16/05/1990.
Aceito para publicação em 01/04/1991.