



ISSN: 1561-3194

Rev. Ciencias Médicas. abril-jun. 1999; 3(1):16-23

ARTÍCULO ORIGINAL

Evaluación de antígeno leptospiral con suero hiperinmune humano y animal mediante microELISA y microalutinação

Antigen of leptospirosis, its assessment with human and animal hyperimmune serum through MicroELISA and microagglutination

Hidelfonso Cabezas Alfonso¹, Idania Barrios Pereda², Lázara Mayra Díaz Álvarez³, Emilia Coniel Linares⁴.

¹DrC. Profesor Titular. Agentes Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Ernesto Che Guevara De La Serna". Pinar del Río.

²Instructor. Agentes Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Ernesto Che Guevara De La Serna". Pinar del Río.

³Especialista en Producción de Biológicos. Facultad de Ciencias Médicas "Dr. Ernesto Che Guevara De La Serna". Pinar del Río.

RESUMEN

El ELISA ha demostrado alta sensibilidad para el diagnóstico de diversas enfermedades y patologías y también para el diagnóstico serológico de leptospirosis. Muchos investigadores han elaborado antígenos de distintas cepas leptospirales con propósitos diagnósticos, con resultados satisfactorios. Este trabajo tiene como objetivo evaluar un antígeno leptospiral elaborado con una cepa virulenta utilizando la técnica de microELISA comparándola con la microaglutinación que es la técnica de referencia de la OMS. Se estudiaron cuatro sueros hiperinmunes de pacientes con leptospirosis de los cuales se aislaron cuatro cepas, cuatro sueros de cordón umbilical de la sección SUMA Hospital «Pepe Portilla», nueve sueros hiperinmunes de conejos y diecinueve sueros de trabajadores de la Facultad de Ciencias Médicas antes de vacunarse. Para la microaglutinación se emplearon veinte serogrupos de leptospiras enfrentándoles a los sueros diluidos desde 1:50 hasta 1:25600 y para microELISA se diluyó desde 1:2 hasta 1:256. En microELISA se empleó un policlonal de IgG, IgA e IgM marcado con peroxidasa de la firma SIGMA suministrado por el laboratorio de leptospirosis del IPK. Los resultados coincidentes 100% entre ambas técnicas respecto a los sueros hiperinmunes humanos, 100 % no coincidentes con los conejos, 100% con los sueros controles negativos de cordón umbilical y 94.8 % coincidentes en los sueros de trabajadores tanto positivos como negativos. Se concluye que el antígeno utilizado se fijó excelentemente a las placas para microELISA. Se demostró la heterología de la región FC de las IgG de conejo y las inmunoglobulina anti FC humanas. También la coincidencia de casi 95% entre ambas técnicas para el diagnóstico normal brinda ventajas técnicas, económicas y sociales.

DeCs: MicroELISA, LEPTOSPIROSIS, INVESTIGACION

ABSTRACT

The ELISA has proved highly sensitive to the diagnosis of several diseases and pathologies, as well as to the serological diagnosis of leptospirosis. Many researchers have made antigens from different leptospiral strains for diagnostic purposes obtaining satisfactory results. The objective of this paper is to assess the leptospiral antigen made from an avirulent strain by using a microELISA technique of WHO. Four hyperimmune sera from patients with leptospirosis were studied. Four strains, four umbilical cord sera from SUMA department of Pepe Portilla Hospital, nine hyperimmune sera from rabbit and 19 sera from workers of the Faculty of Medical Sciences (before vaccination) were isolated. Twenty leptospiral serogroups against the diluted sera from 1:50 to 1:25600 were used for microagglutination, whereas microELISA was diluted from 1:2 to 1:256. For microELISA, we used an IgG, IgA and IgM polyclonal marked with peroxidase (SIGMA) by IPK leptospirosis laboratory. Identical results (100%) were obtained in both techniques with respect to human hyperimmune sera, 100% was not consistent with those of the rabbits, 100% with the sera of umbilical cord from negative controls and 94.8% were consistent with sera from workers (disregarding their positiveness or negativeness). It is concluded that the antigen used had an excellent fixation to the slides for microELISA. Heterology of FC region from rabbit's IgG and immune globulines anti FC humans was shown. Technical, economic and social advantages can be achieved taking into account the coincidence (95%) between both techniques for normal diagnosis.

INTRODUCCIÓN

Las técnicas inmunoenzimáticas directas e indirectas usadas en diagnóstico de distintas enfermedades y patologías han resultado extraordinariamente sensibles y eficientes detectándose anticuerpos según criterios cuantitativos de 0.0005 mg/ml en suero, al mismo nivel de radioinmunoanálisis.¹

La técnica de ELISA se ha empleado por distintos laboratorios en el mundo para el diagnóstico de la leptospirosis, utilizando diferentes cepas de leptospira tanto de referencia como cepas aisladas por los investigadores comparándolas con la microaglutinación.²⁻¹¹ Por ejemplo, en Brasil se ha empleado en la detección de ciertos niveles de IgM para diagnosticar leptospirosis a través de la saliva.¹²

Los autores del presente trabajo se trazaron como objetivo principal evaluar la efectividad de un antígeno leptospiral para el diagnóstico empleando la técnica de microELISA comparándola con la microaglutinación. Este antígeno fue elaborado por investigadores de la facultad de ciencias médicas con una cepa virulenta. Se compararon los resultados con la microaglutinación por ser la técnica de referencia hasta el momento actual.

METODOS

Durante 1997 se realizó una investigación en el laboratorio de leptospirosis de la Facultad de Ciencias Médicas de Pinar del Río con un antígeno leptospiral (AgLep) para el diagnóstico de la enfermedad.

Las técnicas utilizadas en la investigación fueron la microaglutinación (MA) y microELISA (ME) comparándola entre sí ya que la MA es la técnica de referencia de OMS. En el estudio se emplearon cuatro sueros hiperinmunes de personas ingresadas en el Hospital "Abel Santamaría" con leptospirosis y de las cuales se aislaron cuatro cepas de leptospira mediante hemocultivos. Como controles negativos se utilizaron cuatro sueros de cordón umbilical procedente de la sección SUMA del Hospital "Pepe Portilla", se usaron también como controles nueve sueros hiperinmunes de conejos elaborados en el laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas mediante la inoculación de los animales con cepas vivas de referencia.

Se investigaron diecinueve sueros de trabajadores de la Facultad de Ciencias Médicas que recibieron la primera dosis de vacuna antileptospiral que ensaya el Instituto "Finlay".

Para la MA se utilizaron veinte serogrupos de leptospirosis enfrentándoles a los sueros diluidos desde 1:50 hasta 1:25600 dependiendo si eran hiperinmunes o no. En el caso de microELISA se diluyeron desde 1:2 hasta 1:256 dependiendo también si eran hiperinmunes o no. En el recubrimiento de la placas se utilizó el AgLep elaborado y se desarrolló posteriormente todo el proceso clásico de la técnica de ME. El conjugado utilizado fue un polivalente de IgG, IgM e IgA de la firma SIGMA donada a los investigadores de la Facultad de Ciencias Médicas por el laboratorio de leptospirosis del IPK.

Las cepas de leptospirosis para MA poseían una concentración aproximada de 3×10^8 con motilidad y pureza conforme a lo establecido y los títulos

positivos se consideraron a partir de la dilución primaria de 1:50. Los títulos positivos y negativos de ME se evaluaron por cuantificación de densidad óptica (DO) mediante lector de ME.

RESULTADOS

Se aprecia una coincidencia de 100% (tabla 1) entre MA y ME en relación con los sueros hiperinmunes resultando positivos con títulos altos así como también con los sueros controles negativos.

Tabla 1. Efectividad del AgLep comparando ME y MA en sueros humanos hiperinmunes y de cordón umbilical.

Muestra	Sueros humanos hiperinmunes		Muestra	Sueros controles cordón umbilical	
	ME Títulos	MA Títulos		ME Títulos	MA Títulos
1	1:64	1:3200	1	-	-
2	1:128	1:12800	2	-	-
3	1:32	1:3200	3	-	-
4	1:256	1:12800	4	-	-
2	1:128	1:12800			
2	1:128	1:6400			

Porcentaje de coincidencia 100%; ME: microELISA;
MA: microaglutinación - negativo

Al comparar ambas técnicas (tabla 2) en relación con los sueros hiperinmunes de conejo hubo una coincidencia de 0% de ME y 100% de MA lo que sirvió de control de heterogeneidad de la región FC de ambos polivalentes.

Tabla 2. Efectividad del AgLep comparando anticuerpos heterólogos de conejos contra antiinmunoglobulinas humanas y en sueros humanos.

Muestra	Sueros humanos hiperinmunes		Muestra	Sueros controles cordón umbilical	
	ME Títulos	MA Títulos		ME Títulos	MA Títulos
1	-	1:3200	1	-	-
2	-	1:3200	2	+	1:50
3	-	1:12800	3	+	1:50
4	-	1:6400	4	+	1:50
5	-	1:25600	5	-	-
6	-	1:6400	6	-	-
7	-	1:25600	7	+	1:100
8	-	1:25600	8	-	-
9	-	1:12800	9	+	1:100
100 % de coincidencia heteróloga			10	+	1:100
			11	-	1:50
			12	-	-
			13	+	1:50
			14	+	1:50
			15	+	1:100
			16	-	-
			17	-	-
			18	+	1:100
			19	-	-
			94.8 % de coincidencia + y -		

AV: antes de vacunarse
 - negativo
 + positivo

En el caso de los sueros de los trabajadores del pesquero previo a la vacunación sometido a ambas técnicas (Tabla 2) se observó un 94% de coincidencia de positivos y negativos sumados.

DISCUSIÓN

No cabe dudas de la sensibilidad de ME para la confirmación de sueros positivos y en general para el diagnóstico y que el AgLep elaborado con este fin se fijó muy bien en las placas, hasta el punto de poder titular mediante esta técnica los sueros hiperinmunes humanos, cuestión de gran importancia para el trabajo de diagnóstico e investigación.

Una cuestión original es que demostrada mediante la no coincidencia de ME y MA respecto a los sueros de conejo, la heterogeneidad de la región FC de las inmunoglobulinas IgG1, IgG2, IgA1, IgA2 IgM de estos animales y las IgG1, IgG2, IgA1, IgA2 e IgM anti FC humanas. En algunos textos se expresa que el conejo posee estas clases y subclases de inmunoglobulinas pero de lo que no se habla es de su heterogeneidad concreta. La especificidad de ME como técnica inmunoenzimática se demuestra en este detalle pues es evidente que el policlonal de inmunoglobulinas presente en el conejo se fijó por su región hipervariable al AgLep dejando al descubierto su FC pero el conjugado anti FC humano no era compatible y no se fijó yéndose en dos lavados. En relación con los otros sueros humanos los resultados coinciden con otros autores (2,6) respecto a la sensibilidad de ME al compararse con MA. En el presente trabajo se apreció una relación bastante precisa (94,8%) con la dilución 1:10 de ME y la positividad de MA a partir de 1:50 lo que demuestra la efectividad del AgLep para fines diagnósticos elaborado con una tecnología propia de la Facultad de Ciencias Médicas.

Concluyendo sobre lo antes planteado se demostró la efectividad del AgLep para el ME lo que trae consigo ventajas técnicas ya que no es necesario manipular cepas vivas y puede estudiarse a la vez noventa sueros con mucha más rapidez que por otro método y un nivel de certidumbre de 95% aproximadamente lo que constituye ventajas económicas, de tiempo y otros reactivos así como sociales pues el diagnóstico sale en menor tiempo hacia los pacientes. El hecho de que se titule o no, no es tan importante como que se plantea la positividad o no para que el clínico actúe rápidamente y porque el tratamiento se hace con un único antibiótico independientemente del serogrupo de leptospira.

Por otra parte queda el aporte de conocimiento relacionado con la heterogeneidad entre clases y subclases de inmunoglobulinas usadas entre estas dos especies que aparentemente parecen guardar relación al menos por sus siglas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Talaska Fischbach F. A manual of laboratory and diagnostic test. Fourth Edition. USA : Philadelphia, 1992.
2. Petchal B, Hirauros S, Humatorn M, Patha V. Liesuwan C, Enzyme linked immunosorbent assay for leptospirosis immunoglobulin using surface antigen from pathogenic leptospira: A comparison hemagglutination and microagglutination test. J Mined Asivi Thai 1992; 75: 203-208.
3. J, B, Thomas C B, Collins N T. Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay that uses the 41 kd flagelin as the antigen for detection of antibody to *Borrelia burgdorferi* in cattle Am J Vet Res 1994;55:1219-1223.
4. Sting R, Dura V. Isolation of serovar specific leptospiral antigen for use in enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) compared with the microscopic agglutination test and immunofluorescence. Zentralbl Veterinarmed (B) 1994; 41: 166-175.
5. Liu T; Shii MM, Long J, Study on the early serodiagnostic of leptospirosis by dot ELISA. Chung Hua Lui Ping Tga Chin 1994; 15:223-226.
6. Silva M Vda, Diog Casnargo L, Adelaide J, Gauza AMC de, Uveda M, Sakata EE. Test inmunoenzimático (ELISA para detección de anticorpos circulante, da classe IgM na leptospina humana Rev Inst med Trop Sao Paulo 1998; 30:95-100.
- 7- Diog Camargo E, Siva M Vda, Batista L, Vag A J, Sakata EE, Avaliação de test ELISA IgM no diagnóstico precoce da leptospirose humana Rev. Inst Med Trop Sao Paulo 1992; 35:355-357.
8. Silva M Vda, Diog Casnargo E, Vaz A J, Souza A M Chirffi PP, Sakata EE. Inmudiagnóstico da leptospirose humana a través de teste ELISA IgM empregando diferentes preparações antigénicas a partir de serotipos prevalentes e leptospira interrogans. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 1990; 32:233-239.
9. Cousive da Robertson gm Parkinson J, Richard R B. Use of the enzyme linked immunosorbent assay ELISA to detect IgM and IgG antibody response to leptospira

interrogans serovar hardio inpregnant rwes. Inst J Med Mmicrobial 1991; 275: 335 - 342.

10. Cinco M, Balangen D, Banf E. Evaluation of an inmmunosorbent test (ELISA) for the diagnosis of leptospirosis IN Italy. Eur J Epidemiol 1992; 8: 677-682.

11. Cabezas H, Sánchez C, Bencomo F, Bencomo L, Cires A, Barrios I. Ensayo inmunoenzimático para un antígeno leptospiral: Descripción y Resultados. Primer encuentro Internacional de Inmunodiagnóstico; Inmunoensayo 97, La Habana Cuba, 1997:104.

12. Silva M Vda, Diog Casnargo E, José Vaz A, Batista L. Inmudiagnosis of human leptospirosis using saliva. Transaction of yhe Royal Society of Tropical Medcine and Hygiene 1992; 86: 560-561.

Recibido: 17 Julio 1998
Aprobado: 17 Julio 1998

Dr. Hidelfonso Cabezas Alfonso. Facultad de Ciencias Médicas, Km 89 Carretera Central, Código: 20200 Pinar del Río.