

Inmuno-electro-precipitación

NUEVO PROCEDIMIENTO DE VISUALIZACION DE REACCIONES ANTIGENO - ANTICUERPO

Doctores: MIGUEL GUZMAN *
ERNESTO BARBOSA **
Señorita: ELIZABETH CASTANEDA ***

INTRODUCCION

El presente trabajo tiene por objeto presentar y discutir un procedimiento nuevo para la detección y estudio de reacciones antígeno-anticuerpo.

MATERIAL Y METODOS

1 — Antígenos:

a) Los antígenos micóticos fueron preparados con cepas diferentes de *Sporothrix schenckii*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Aspergillus fumigatus*; de los dos primeros solamente antígenos levaduriformes.

b) El antígeno viral usado en algunas reacciones fue vacuna antirrábica gentilmente suministrada por el doctor Guillermo Mendoza del Laboratorio de Producción de Vacuna Antirrábica del INPES.

c) La toxina diftérica usada en algunas reacciones fue toxina standard suministrada por el doctor Alvaro

Aguilera del Laboratorio de Producción de D.P.T. del INPES.

d) Las nucleo-proteínas usadas en algunas reacciones fueron preparadas por el doctor Gabriel Cerón.

2 — Sueros inmunes:

Los sueros usados en las pruebas con antígenos micóticos fueron obtenidos por inoculaciones repetidas de los antígenos respectivos en animales de experimentación.

a) Los sueros hiperinmunes antirrábicos fueron preparados en caballo y suministrados por el Laboratorio de producción de vacuna antirrábica INPES.

b) Los sueros antidiftéricos fueron obtenidos en conejos y suministrados por el Laboratorio de Producción D.P.T. - INPES.

c) Los sueros usados en las reacciones antinucleoproteínas fueron sueros de pacientes con Lupus Eritematoso clínicamente activo gentilmente suministrados por el doctor César Mendoza del Hospital San Juan de Dios de Bogotá.

* Jefe Sub-Grupo Microbiología e Inmunología INPES. Profesor Asociado de Inmunología. Fac. Med. U. Nal.

** Jefe Grupo Bioquímica INPES. Profesor Asociado de Bioquímica. Fac. Med. U. Nal.

*** Lic. en Microbiología - INPES.

3 — Medio de soporte:

En las reacciones descritas se usó como medio de soporte Agar Noble (Difco) y buffer de veronal pH 8.6.

4 — Sueros controles:

Se usaron como control sueros de animales no infectados y sueros de personas supuestamente sanas.

5 — Electroforesis:

Se utilizó para las pruebas de inmunolectroprecipitación una cámara Beckman con fuente de poder, igualmente Beckman.

Los antígenos levaduriformes de *Sporothrix schenckii* fueron preparados de acuerdo a la técnica descrita por Karlin y Nielsen⁵ (1970). Los antígenos de fase levaduriforme de *Paracoccidioides brasiliensis* fueron preparados según la técnica descrita por Restrepo y Schneidau¹⁰ (1967), los antígenos de *A. fumigatus* fueron preparados según la técnica dada por Pepys y colaboradores⁸ (1959). Los sueros hiperinmunes se obtuvieron mediante inoculaciones adecuadas de los agentes correspondientes a Cobayos; cuando se consideró que los animales tenían niveles adecuados de anticuerpos, se practicó en ellos pruebas de hipersensibilidad retardada mediante inoculación intracutánea de 0.1 ml. de una suspensión al 1:100 en solución salina del antígeno correspondiente, en un área abdominal previamente rasurada; como control se utilizó 0.1 ml. del medio correspondiente en el cual se preparó el antígeno, los animales que presentaron una reacción positiva; a

las 24-48 horas, fueron sangrados, el suero obtenido se adicionó de Merthiolate al 1:10.000 y se congeló a -20° C. para uso posterior.

El medio soporte se preparó con Agar Noble (Difco) al 1.5% en buffer de veronal pH 8.6; una vez fundido, se repartió en tubos independientes en cantidades de 10 ml. guardándose a 4°C para ser usados en el momento oportuno. Placas de vidrio de 6 x 10 cms desengrasadas y limpias se cubrieron con fina capa de agar adhesivo dejándose secar en la estufa a 37°C; cuando éstas estuvieron listas, se fundió el agar, previamente preparado, y una vez que éste estuvo en una temperatura de 50°C, se le adicionó el antígeno correspondiente sin diluir en forma tal que finalmente quedara a una concentración del 20% (0.2 ml. de antígeno por ml. de agar fundido), rotándose fuertemente en las manos para lograr una distribución homogénea en el medio y vertiéndose inmediatamente sobre las láminas de vidrio colocadas sobre una mesa nivelada. Una vez que éstas estuvieron solidificadas, se guardaron en nevera por 30 minutos para permitir una mejor estabilización del antígeno en el agar; posteriormente se hizo un orificio de 1.5 mm. x 3 mm. con un dispositivo similar al usado en inmuno-electroforesis sobre un patrón como el que se muestra en la Fig. N° 1; en cada uno de estos orificios se colocó con jeringa Hamilton 2 microlitros de suero así: en el primer orificio, suero puro homólogo del antígeno incorporado; en el segundo y tercer orificios, sueros no homólogos, y en el cuarto en suero control negativo pa-

ra el antígeno incorporado, las placas fueron puestas en la cámara Beckman con buffer veronal pH 8.6 y sometidos a electroforesis por 90 minutos a 250 voltios de corriente continua, al término de los cuales fueron observadas para anotar los resultados obtenidos. Para conservación permanente las placas fueron lavadas con solución salina durante 18 horas, secadas en estufa a 37°C y coloreadas por 10 minutos en Amido-Black al 0.75% en Metanol-agua-ácido acético (70:20:10) decolorados varias veces en una solución lavadora metanol-agua-ácido acético (70:20:10) y secadas en una estufa a 37°C.

+



Figura 1

Esquema que muestra la localización de los orificios para colocar las muestras de sueros en la placa de agar.

RESULTADOS

Los sueros obtenidos de animales, y estudiados por técnicas de doble inmunodifusión, tipo Ouchterlony⁷ (1953) fueron positivos entre las 48-96 horas, presentando líneas de precipitación aparente, como puede verse en la Fig. N° 2 correspondiente a una reacción de un suero obtenido por inoculación de *A. fumigatus* en cobayo probado frente a antígeno del mismo hongo, pueden verse allí

cuatro bandas de precipitación. En la inmunoelectroprecipitación, una vez finalizado el paso de la corriente, se observa en los casos positivos sobre la zona de migración de las inmunoglobulinas, un cono de precipitación aparente, no presentándose reacción cruzada entre los sueros y antígenos probados. Como puede observarse en la Fig. N° 3 correspondiente a sueros anti-*Aspergillus fumigatus* contra el antígeno correspondiente, una vez coloreada la placa, se aprecian claramente las mismas cuatro bandas de precipitación dispuestas sobre la zona de migración de las inmunoglobulinas e imbricadas una a continuación de la otra.

DISCUSION

La búsqueda de reacciones rápidas, sencillas y específicas, tanto para el diagnóstico como para el estudio de sistemas antígeno-anticuerpo es siempre deseable. En el diagnóstico de las entidades Micóticas, el uso de las reacciones de inmunodifusión tipo Ouchterlony⁷ (1953) ha sido amplia y exitosamente usado por sencillez y especificidad en un buen número de entidades tales como Blastomycosis Norteamericana, Abernathy y Heiner¹ (1961), Histoplasmosis Hainer⁸ (1958), Schubert, Lynch y Ajello¹¹ (1961) Coccidioidomicosis, Huppert y Bailey⁴ (1963), Paracoccidioidomicosis, Restrepo⁹ (1966). Sin embargo, esta reacción toma un tiempo variable entre 24-96 horas; la reacción aquí descrita, cuya utilidad como prueba "screening" puede ser importante por la ventaja de poderse procesar simultáneamente gran

cantidad de muestras obteniéndose un resultado rápido, conservando la misma especificidad, ya que se trata de la precipitación en un medio de soporte de las proporciones óptimas de antígeno-anticuerpo, en este caso al ser incorporado homogéneamente el antígeno en el medio y someter el suero problema a una electroforesis se obliga que las inmunoglobulinas se separen y migren concentradas en una dirección, dándoseles la oportunidad de que encuentren y reaccionen rápidamente con el antígeno incorporado en el medio, los aspectos físicos sobre los cuales se basa esta reacción, son similares a los descritos por Laurell⁶ (1966) y similares a los presentados por Culliford² (1964); como muestra la Fig. N° 4, la electroforesis combina-

da aquí, permite una concentración de las inmunoglobulinas sobre una sola zona, lo cual hace más posible que cantidades muy escasas de anticuerpos se concentren dando una reacción positiva, aumentándose así la sensibilidad de la reacción. Aunque aquí se presenta la reacción más en detalle utilizando antígenos obtenidos de hongos, fundamentalmente compuestos por polisacáridos, la prueba es útil también en todos aquellos casos en que un antígeno soluble pueda ser adecuadamente incorporado en el medio como en caso de virus de la rabia, como puede verse en la (Figura N° 5), o de nucleoproteínas frente a sueros de pacientes en lupus eritematoso (Figura N° 6), o de toxina diftérica frente a su antisuero homólogo (Figura N° 7).

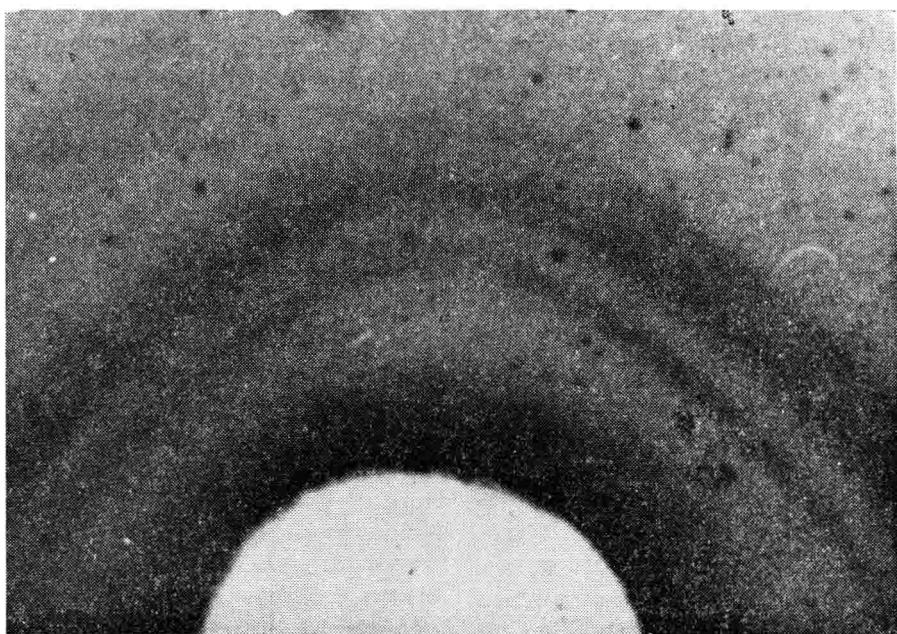


Figura 2

Fotografía que muestra una prueba de doble inmunodifusión. En el orificio central se colocó un suero Anti-A. fumigatus, en los orificios periféricos se colocaron antígenos de A. fumigatus. Nótese la presencia de por lo menos 4 bandas de precipitación.

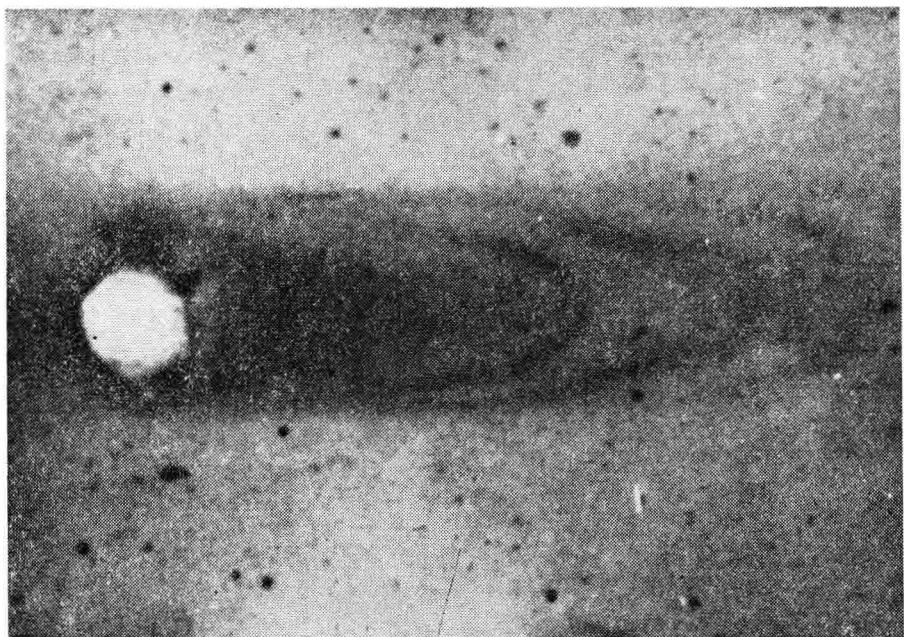


Figura 3

Fotografía que muestra una prueba de inmunolectroprecipitación. En el agar se incorporó el antígeno de *A. fumigatus*, en los orificios se colocó suero hiperinmune. Nótese la presencia de múltiples bandas de precipitación en la zona de migración de las inmunoglobulinas.

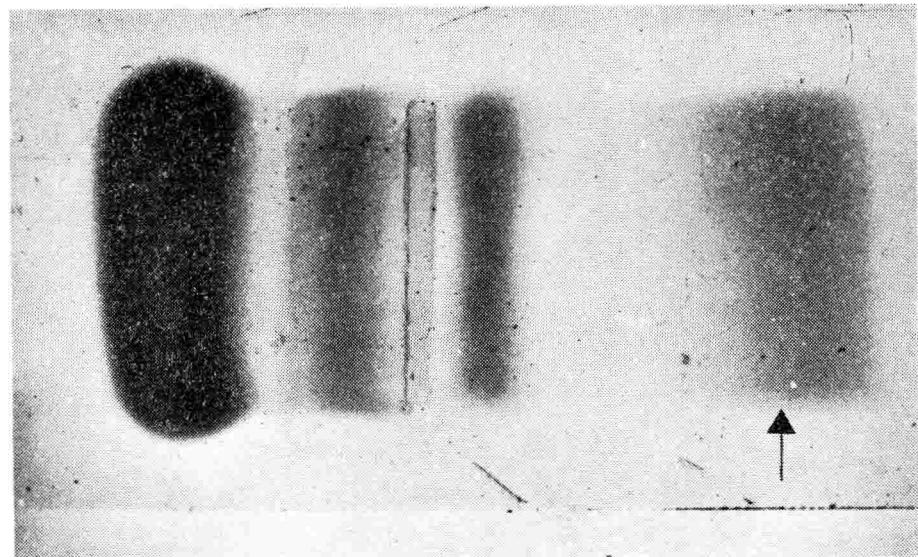


Figura 4

Fotografía que muestra una electroforesis en agar para señalar la concentración de inmunoglobulinas en una zona, técnica que se combina con la inmuno precipitación.

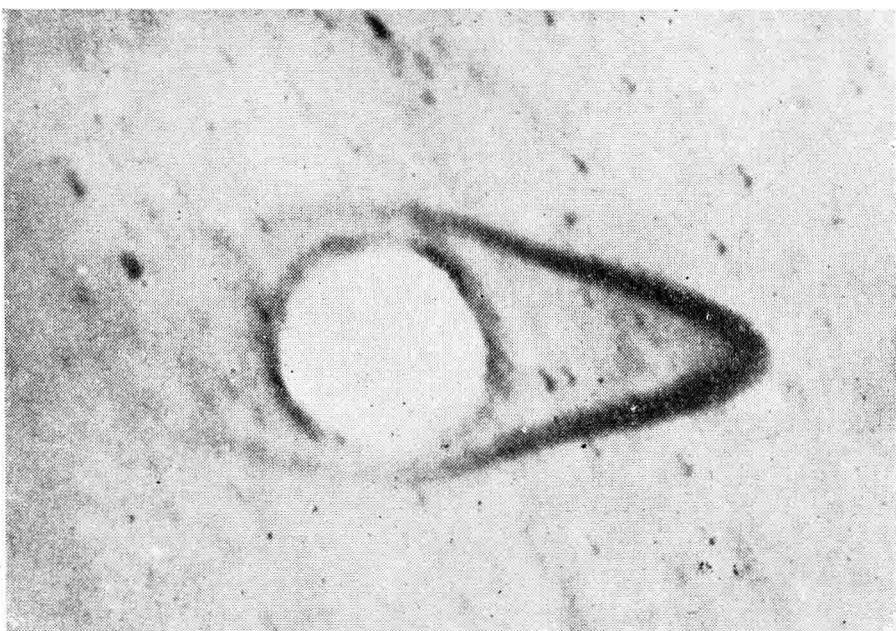


Figura 5

Fotografía que muestra una reacción de inmunoelectroprecipitación con virus de rabia, el virus (vacuna antirrábica) fue incorporado en agar, el anti-suero homólogo se colocó en el orificio y se sometió a electroforesis; nótense la clara banda de precipitación.

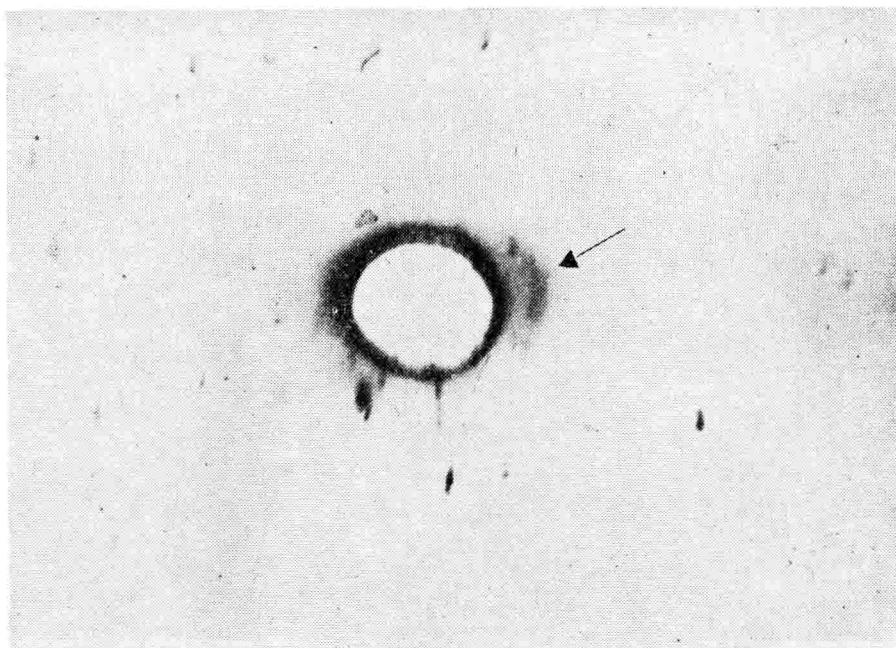


Figura 6

Fotografía que muestra una reacción de inmunoelectroprecipitación con nucleoproteína incorporada en el agar, el suero en el orificio es de un paciente con LES. Nótense la banda de precipitación.

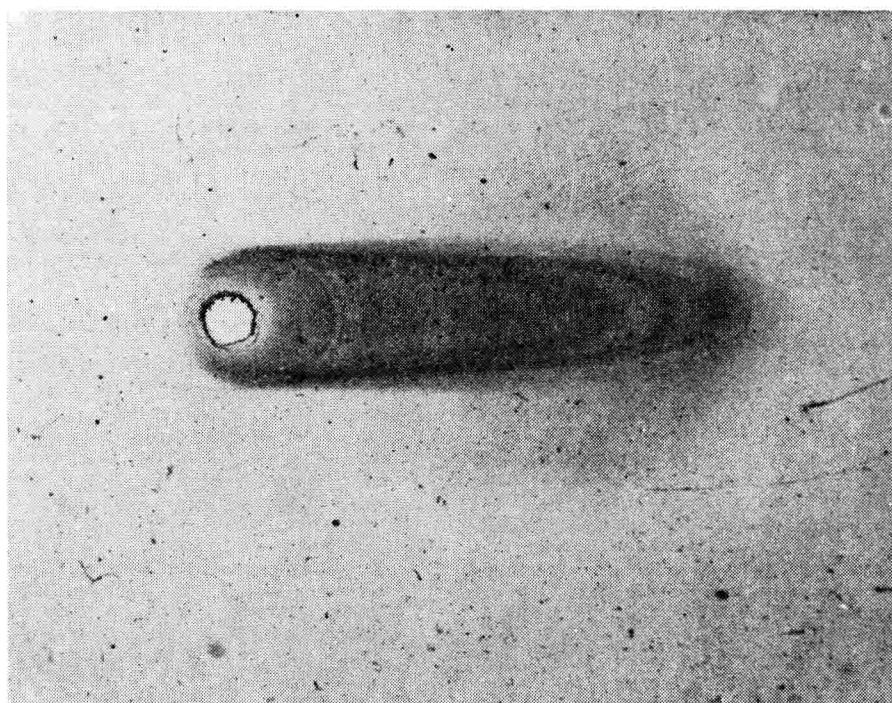


Figura 7

Fotografia que muestra una reacción de inmunoelectroprecipitación con toxina diférctica incorporada en el agar; la antitoxina homóloga se colocó en el orificio. Nótese las múltiples bandas de precipitación.

RESUMEN

Se presenta una técnica para detección de reacciones antígeno-anticuerpo en agar, combinando con elec-

troforesis. La prueba denominada de Inmuno - electroprecipitación puede ser útil en diagnóstico.

SUMMARY

An Inmunoelectroprecipitin tests is described and its applicability in the diagnosis is discussed.

REFERENCIAS

1. Abernathy, R. S. and Heiner, D. C.: **Precipitation reaction in agar in North American Blastomycosis.** J. Lab. Clin. Med. 51: 604-611, 1961.
2. Culliford, Bryan, J.: **Precipitin reaction in forensic problems.** Nature, 201: 1.092, 1964.
3. Heiner, D. C.: **Diagnosis of Histoplasmosis using precipitin - reaction in agar gel.** Pediatrics, 22: 616-627, 1958.
4. Huppert, M. and Bailey, J. W.: **Immunodiffusion as a screening test for coccidioidomycosis serology.** Sabouraudia, 2: 284-291, 1963.
5. Karlin, J. V. and Nielsen, H. S., Jr.: **Serologic Aspects of Sporotrichosis.** J. Infect. Dis. 121: 316-327, 1970
6. Laurell, C. B.: **Quantitative estimation of protein by Electrophoresis in agarose-gel containing antibodies.** Anal. Biochem. 15: 45-52, 1966.
7. Ouchterlony, O.: **Antigen-antibody reaction in gels: IV Types of reactions in coordinated system of diffusion.** Acta Path. et Microbiol. Scandinav. 32: 231-240, 1953.
8. Pepys, J.; Ridell, R. W.; Citron, K. M. Clayton, Y. M. and Short, E. I.: **Clinical and Inmunologic significance of Aspergillus fumigatus in the Sputum.** Am. Rev. Resp. 80: 167-180, 1959.
9. Restrepo, A.: **La prueba de Inmunodifusión en el diagnóstico de la Paracoccidioidomicosis.** Sabouraudia, 4: 223-230, 1966.
10. Restrepo, A. and Schneidau, Jr., J. D.: **Nature of the Skin-reactive principle in culture filtrates prepared from Paracoccidioides brasiliensis.** J. Bact. 93: 1.741-1.748, 1967.
11. Schubert, J. H.; Lynch, H. S. and Ajello, L.: **Evaluation of the agar plate precipitin test for histoplasmosis.** Am. Rev. Resp. Dis. 84: 845-849, 1961.