

ESTUDIOS DE INMUNOPRECIPITACION EN LA LEPROA¹

DR. MARIO SALAZAR-MALLÉN,^{2, 3} Q.B.P. MA. EUGENIA AMEZCUA-
CHAVARRÍA³ Y Q.B.P. ALEJANDRO ESCOBAR-GUTIÉRREZ³

Se hicieron estudios serológicos en 94 casos de lepra pertenecientes a las diferentes variedades, utilizando como antígeno el polisacárido de grupo PolyINB obtenido de cultivos de *N brasiliensis*. Mediante la técnica de doble difusión y precipitación en agar se obtuvieron resultados positivos en el 6.6% de los casos, mientras que siguiendo el método de cromatográfico en papel la positividad alcanzó al 47.9%. Los sueros de 69 sujetos sanos dieron reacción negativa. La cuantificación de anticuerpos mostró tendencia a concentraciones mayores en los casos lepromatosos en comparación con los tuberculoides, pero la diferencia de promedios entre ambos grupos no es estadísticamente significativa. Los sueros de enfermos con tuberculosis pulmonar y con nocardiasis dieron también reacciones positivas. En los casos de muestras de sangre tomada durante la reacción leprosa se observó una tendencia a menor positividad, pero el número de casos observados en ese aspecto no permite por el momento afirmaciones concluyentes. En los casos curados se observó la negativización de la reacción de precipitación. El anticuerpo responsable de la reacción positiva es sensible al 2-mercaptoetanol y pertenece, por lo tanto, al grupo de las inmunoglobulinas pesadas (IgM). (Gac. Méd. Méx. 98: 656, 1968).

EXISTEN numerosos estudios serológicos en relación con la lepra, la mayor parte de los cuales parten de la técnica de hemaglutinación empleando glóbulos sensibilizados con tuberculina,

según Middlebrook y Dubos.^{1, 2} Los resultados al respecto han sido constantes en lo tocante al significado de títulos desde el 1×8 ó el 1×16 .^{3, 4, 5} uniformes en lo referente a la independencia de la positividad y el tipo de lepra³, en la tendencia de los autores a verificar un título más elevado en los pacientes lepromatosos^{6, 7, 8} y su disminución en los leprosos tratados.^{3, 5}

¹ Trabajo presentado en la sesión ordinaria del 6 de septiembre de 1967.

² Académico titular.

³ Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas, Secretaría de Salubridad y Asistencia.

Fukuda,⁹ sin embargo, insiste en el mejor poder sensibilizante de la fracción carbohidrato de *Mycobacterium tuberculosis* en comparación con la proteica e insiste en la falta de correlación entre la situación clínica y el título de aglutinación.

Posteriormente a los anteriores autores Bojalil y Zamora,¹⁰ utilizando la técnica de doble difusión en agar y partiendo de fracciones polisacárido de *Nocardia brasiliensis*, obtienen precipitación con dos sueros de enfermos lepromatosos. Los trabajos de los anteriores autores y el de Zamora y cols.¹¹ permiten distinguir dos clases de polisacáridos inmunológicamente activos de *N. brasiliensis*, uno de grupo denominado PolyINb y que da reacción cruzada con *Nocardia asteroides* y con algunas micobacterias y otro, llamado PolyII Nb propio de la especie (Tabla 1).

cadena principal de galactosa unida en 1,3 y arabinosa unida en 1,2 ó en 1,3 o en ambas y en proporción de uno a uno y residuos no reductores de arabinofuranosa. Es posible que PolyINb sea idéntico al polisacárido llamado AS-Alfa, recientemente obtenido del medio de cultivo de *M. tuberculosis* por Yamamura y col.¹⁴

Una vez que se dispuso de antígeno puro PolyINb, sabiendo sus características químicas y conociendo su presencia en el tejido lepromatoso, se decidió su ensayo con el suero de enfermos lepromatosos, tuberculosos y con micetoma, asunto que es el motivo del presente trabajo.

MÉTODOS

El PolyINb se preparó a partir de un cultivo de tres semanas en medio de Youmans y Karlson de *N. brasiliensis*.

TABLA 1
IDENTIFICACION DE POLYINb EN NOCARDIA Y MYCOBACTERIUM

Germen	PolyINb	Otros polis	Autor
<i>Nocardia brasiliensis</i>	+	Si, PolyIINb	Zamora y col., 1963 y González Ochoa y col., 1962
<i>Nocardia asteroides</i>	+	Si, PolyIINa	Zamora y col., 1963
<i>M. tuberculosis</i>	+	?	Estrada Parra, 1965 y Calderón y col., 1965
<i>M. lepraemurium</i>	+	?	Calderón, 1965
<i>M. leprae</i>	+	Si	Estrada Parra, Calderón, Salazar M. y Amezcua, 1966

Con Estrada-Parra, Calderón, Salazar-Mallén y Amezcua¹² han demostrado que PolyINb existe en el tejido lepromatoso rico en *Mycobacterium leprae*, tocando a Estrada-Parra y col.¹³ su caracterización química, definida como la de un polímero formado por una

sí, siguiendo con modificaciones de interés secundario, el procedimiento recomendado por Zamora y cols.¹¹ los cuerpos microbianos se desgrasaron con alcohol-acetona durante 3 a 4 semanas, se secaron al vacío y se molieron con granalla de vidrio con una cantidad

mínima de cloruro de potasio 3M, separando el sobrenadante de los restos celulares mediante centrifugación en frío.

Al sobrenadante se le agregaron 10 volúmenes de metanol a 4°C., se le dejó en el refrigerador 24 horas y se le centrifugó, recogiendo el sedimento y secándolo al vacío.

El precipitado se disolvió en solución reguladora de fosfatos 0.02 M y a un pH de 7.2, dializándolo contra agua corriente durante 72 horas, procediéndose a una nueva precipitación con metanol y agregando acetato de sodio para tener una concentración final del 3%.

A las 24 horas de permanencia en el refrigerador se obtuvo nuevo precipitado que se disolvió en 100 ml. de solución reguladora de carbonatos 0.02 M., con pH de 9 a 10. Mediante centrifugación se separó el precipitado conteniendo el PolyII, y con el sobrenadante, portador del PolyI se procedió a la desproteinización con un volumen igual de la mezcla de cloroformo-butanol 9 × 1, agitada fuertemente y dejada en la noche en el refrigerador.

Se recogió la fase acuosa repitiéndose la desproteinización hasta eliminar las proteínas y precipitando el PolyI con nueve volúmenes de metanol a 4°C., conteniendo un volumen de acetato de sodio al 30%, neutralizando con ácido acético.

Después de hacerla permanecer en el refrigerador por toda la noche, se obtuvo mediante precipitación un sedimento que se lavó con metanol 3 ó 4 veces, disolviéndolo en agua a pH de

8, dializándolo contra agua destilada durante 48 horas, liofilizándolo y pesando el polvo, cuya estandarización química se hizo con reactivo de fenol.

Los sueros de enfermos leproso se obtuvieron, en su mayoría, al través de la "Campaña de Control de Enfermedades Crónicas de la Piel", cuyos leprólogos hicieron el diagnóstico. Las muestras se conservaron congeladas hasta su empleo y se les utilizó sin inactivar.

Los sueros de enfermos tuberculosos pertenecieron a pacientes de la Unidad de Neumología del Centro Médico Nacional, tratándose en todos los casos de pacientes con tuberculosis pulmonar.

Los sueros de enfermos con nocardias no fueron proporcionados por el Dr. A. González Ochoa y correspondió a enfermos infectados con *N. brasiliensis* sometidos o no al tratamiento quimioterápico.

Los sueros de individuos sanos se obtuvieron de personas clínicamente conocidas y sin tomar en cuenta, además del estado de salud, otros datos, cómo podrían haber sido la tuberculinorreacción, la leprominorreacción, etc.

La reacción de precipitación en agar se hizo siguiendo el método de Ouchterlony¹⁵ con una concentración de PolyINb de 500 microgramos/ml. y a pH de 6.2. Los sueros se utilizaron sin diluir, las cajas se dejaron 48 horas a la temperatura ambiente y después 24 horas en el refrigerador.

La técnica cuantitativa de precipitación en papel se hizo de acuerdo con el método cromatográfico descrito en 1950 por Ruiz-Castañeda,¹⁶ a saber:

1. Se pusieron en contacto 0.2 ml. de suero con un volumen igual de antígeno (PolyINb) conteniendo 500 microgramos/ml. disueltos en solución salina.

2. La mezcla se incubó durante 60' a 37°C., dejándola después y durante la noche en el refrigerador.

3. Se tomaron 0.2 ml. de esta mezcla, colocándolos en el extremo de una tira de papel Whatman Núm. 1, de 3 cm. $\times$ 26 cm.

4. Una vez absorbido el líquido por el papel, se colocó éste último en posición vertical en la cámara de cromatografía, dejando su extremo sin mezcla sumergido en la cubeta con solución amortiguadora de barbituratos pH 8.6 y con 7.5 g/lit. de cloruro de sodio.

5. Se dejó descender la solución durante 24 horas y las tiras todavía húmedas se sumergieron en un baño con "Amido Black 10B", con una concentración de 0.29 gramos por litro de la mezcla de etanol-ácido acético glacial 9 $\times$ 1. La tinción se produjo a los 20'.

6. Se procedió a la decoloración de las tiras, pasándolas 2 ó 3 veces por un baño de la mezcla ácido acético glacial 100 ml. y fenol líquido 40 ml. con agua destilada para completar 1 lit.

7. Se secaron las tiras de papel en el horno y a 120°C.

8. Se recortó el área de la mancha.

9. Se eluyó el colorante durante 24 horas y en el refrigerador, en 6 ml. de una solución de NaOH 0.2 N.

10. La lectura de nitrógeno se hizo en espectrofotómetro Zeiss, en la banda de 595 m μ , expresándose en mcg. de anticuerpo, en comparación con la lec-

tura de un testigo montado con cada muestra del suero sin PolyINb.

Para distinguir el carácter ligero (IgG) o pesado (IgM) de los anticuerpos precipitantes, un número limitado de sueros pertenecientes a las dos variedades de lepra, y que habían dado precipitación se trataron de acuerdo con Ishisaka y cols.,¹⁷ como sigue:

1. Se mezcló una alícuota del suero con un volumen igual de 2 mercaptoetanol 0.1 M., dejándose la mezcla 2 horas a la temperatura ambiente y durante la noche en el refrigerador.

2. El complejo se dializó durante 48 horas contra solución salina, en el refrigerador y agitándolo con un agitador magnético.

3. Se procedió al ensayo cromatográfico del suero sometido al 2-mercaptoetanol, empleando como testigo el mismo suero no sometido a tratamiento con el último reactivo.

RESULTADOS

La reacción de precipitación en agar sólo resultó positiva en seis de los 96 leprosos, todos los cuales correspondieron a la variedad lepromatosa. Los sueros de los individuos sanos no dieron banda de precipitación.

La cuantificación mediante la cromatografía en papel dio los resultados que pueden advertirse en la tabla 2. El 47.8% de las muestras obtenidas de enfermos leprosos dio cantidades de anticuerpo por encima de 5 mcg/ml., valores que fueron considerados positivos ya que los sueros de los 69 individuos sanos dieron cifras de nitrógeno infe-

TABLA 2
INMUNOPRECIPITACION CON SUEROS DE LEPROSOS

	En agar		En papel		Total
	+	—	+	—	
Lepromatosos	6	65	35	36	71
Tuberculoïdes	0	13	6	7	13
Dimorfos	0	0	1	0	1
Indeterminados	0	0	3	6	9
Sanos	0	0	0	0	69

riores, haciendo un promedio menor que el de 1 mcg/ml. de N por ml.

Los resultados de la reacción cuantitativa pueden verse en la Tabla 3, siendo de notar el promedio más elevado de anticuerpo (17.0 mcg/ml) en los lepromatosos, en comparación con 10.6 para los tuberculoïdes, pero sin que la diferencia entre ambos grupos resultara estadísticamente significativa.

TABLA 3

CANTIDAD DE ANTICUERPOS (EN N)
EN LOS SUEROS POSITIVOS

Variedad de lepra	mcgr	N/ml.	Núm. de casos
Lepromatosa	17.0 ± 11		35
Tuberculoïde	10.6 ± 7.4		6
Indeterminada	12.6		3
Dimorfa	11.0		1

Los resultados en lo tocante a respuesta de anticuerpo y reacción leprosa en los enfermos lepromatosos se expresa en la Tabla 4. Nótese la tendencia a más reacciones negativas en este grupo, aunque en los tres casos positivos la cantidad de anticuerpo no fue diferente de la obtenida como promedio en los demás casos. En dos casos con reacción positiva y al obtenerse la curación bacteriológica y clínica tras el tratamiento quimioterápico, desapareció el anticuerpo para el Poly INb.

TABLA 4

CANTIDAD PROMEDIO DE ANTICUERPOS EN LA REACCIÓN
LEPROSA E INFLUENCIA
DEL TRATAMIENTO

	Promedio en mcgr. N/ml.		—	Núm.
	+	—		
L. en reacción	3	16.0	7	10
L. manchada (Lucio)	1	11	1	2
Curados	0	0	2	2

Seis sueros de enfermos leprosos con reacción positiva y correspondiendo la mitad respectivamente a las variedades lepromatosa y tuberculoïde fueron sometidos al tratamiento con 2-mercaptoetanol, observándose disminución del título de precipitación, suceso que apunta hacia la presencia en una y en otra variedad del mismo tipo de anticuerpo, perteneciente a la clase IgM, cuya estructura cuaternaria y comportamiento afecta el precipitado reactivo.

En contraste con el caso de la lepra, en fin, los sueros de enfermos con tuberculosis pulmonar y con nocardiasis por *N. brasiliensis*, como puede verse en la Tabla 5, dieron usando la técnica en el papel una menor proporción de positividad mostrando, asimismo, un más bajo nivel de anticuerpo.

TABLA 5

CANTIDAD PROMEDIO DE ANTICUERPOS EN LA TUBERCULOSIS PULMONAR Y EN CASOS DE NOCARDIASIS (*N. brasiliensis*)

		Prome- + dio	— Núm.	
Tuberculosis pulmonar	4	10.7	14	18
Nocardiasis	3	9.6	3	6

DISCUSIÓN

Mediante el método de hemaglutinación, según Middlebrook y Dubos, más o menos modificado, diversos autores han obtenido mayores títulos de hemaglutinación con los sueros de enfermos leprosos en comparación con los normales, fenómeno comparable al encontrado por nosotros empleando el antígeno PolyINb, siguiendo la técnica cromatográfica de Ruiz-Castañeda, y determinando el nitrógeno proteico del precipitado fijado en el papel, pero a diferencia de los estudios hechos previamente, en el presente estudio se partió de un antígeno purificado y químicamente definido y que por no tener nitrógeno en su molécula permitió la cuantificación del anticuerpo, circunstancias que favorecerán la obtención por parte de otros investigadores, de resultados comparables con los nuestros, tanto en lo cualitativo (reacción positiva o negativa) como en lo cuantitativo.

En lo tocante a la especificidad de la técnica seguida, es de advertir que por utilizar un antígeno de grupo y como se esperaba, se obtuvieron reacciones cruzadas en los casos de infección por otras micobacterias (tu-

berculosis pulmonar) y en enfermos con nocardiasis, suceso inconveniente si se piensa en los problemas del diagnóstico en los casos de infección mixta, pero que conserva interés desde el punto de vista inmunológico, ya que ofrece otra prueba de la semejanza del mosaico antigénico de *Nocardia* y de *Mycobacterium*.

En lo relativo a la sensibilidad, los autores convienen en que estos resultados positivos son inferiores a los alcanzados mediante la técnica de la hemaglutinación por Lucentini y Nazaro,⁸ por Ross⁴ y por Levine y cols.,¹⁸ acercándose a los informados por Madorsky y col.;⁶ pero en su favor debe tomarse en cuenta el hecho de que ninguno de los sueros de 69 sujetos sanos dio resultado positivo; es decir, que no se encontraron reacciones falsas positivas, lo que es un dato importante tratándose de un estudio cuya aplicación a la clínica es imaginable.

Los resultados serológicos en relación con los diferentes tipos de lepra enseñan la mayor positividad, medida como mayor frecuencia de resultados significativos y más elevado título de hemaglutinación, tratándose de los enfermos lepromatosos en comparación con los tuberculoides, fenómeno sobre el cual sólo se puede decir que, comparando la cantidad de anticuerpo obtenido en el corto número de leprosos tuberculoides disponibles, con el verificado en los lepromatosos, se obtuvo un promedio menor (10.6 mcg/ml.) en los primeros, en relación con los últimos (17.0 mcg/ml.) y dejando en pie el hecho de que la precipitación se

obtuvo en todas las formas de lepra, incluyendo los casos indeterminados.

En los casos de reacción leprosa se observó tendencia a la menor positividad (la tercera parte de reacciones positivas en comparación con la mitad casi en el conjunto total de lepromatosos), fenómeno que convendrá volver a estudiar examinando mayor número de casos en reacción, tomando nota de la intensidad de ésta y siguiéndola serológicamente hasta su desaparición. Provisionalmente estos resultados parecen sugerentes de captura del anticuerpo bajo la forma de complejo antígeno-anticuerpo, al nivel de los tejidos dañados, pues como los autores han demostrado en otro lugar, los leprosos son portadores de bacilos que en la sangre circulan unidos al anticuerpo para PolyINb.¹⁹

En unos cuantos casos, en fin, en los que fue dado seguir a los enfermos a lo largo de su tratamiento con DDS, se observó que al comprobarse la curación clínica y bacteriológica de dos sujetos su serología se hizo negativa, fenómeno acorde con la desaparición del estímulo antigénico.

SUMMARY

Serological studies were made using the chemically defined antigen from *Nocardia brasiliensis* Poly I Nb that has shown to exist in lepromatous tissue and sera from lepers belonging to the different types of the disease.

Surface fixation on paper gave positive precipitation in 47.9% of the sera from lepers, the results being unifor-

mely negative with sera from 69 healthy individuals.

The amount of antibody was higher in lepromatous than in tuberculoid patients, and became negative in two cured cases.

Since the antigen PolyINb is group specific, positive results were recorded as expected in a limited number of cases of nocardiasis and in tuberculosis, the level of antibody being, however, in these latter instances lower than in lepromatous lepers.

By using the inhibitory activity of 2-mercaptoethanol it was found that the antibody responsible for the precipitation belongs, regardless of the form of leprosy, to the IgM group of the immunoglobulins.

REFERENCIAS

1. Middlebrook, G. y Dubos, R.: *Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli*. J. Exper. Med. 88: 521, 1948.
2. Scott, N. B., Smith, D. T. y Durham, N. C.: *A simple modification of the Middlebrook and Dubos hemagglutination test for serum antibodies to products of tubercle bacilli*. J. Lab. Clin. Med. 38: 303, 1950.
3. Plissier, M. y Secret, E.: *La réaction d'hémagglutination de Middlebrook et Dubos chez 37 lépreux*. Maroc. Méd. 32: 779, 1953.
4. Ross, H.: *The results of a modified Middlebrook-Dubos hemagglutination test in leprosy; 261 cases*. Int. J. Lepr. 22: 174, 1954.
5. Gernez-Rieux y Tacquet, A.: *L'hémagglutination et l'hémolyse conditionnée. Application au diagnostic de la tuberculose et de la lèpre*. Semaine Hop. de Paris 32: 1129, 1966.
6. Madorsky, M., Bachrach, U., Gurevitch, J. y Sagher, F.: *Hemagglutination test in tuberculosis and leprosy*. Bull. Res. Council of Israel 2: 449, 1953.

7. Viette, M.: *Réactions d'hémagglutination et d'hémolyse conditionnée dans la lèpre*. Ann. Inst. Pasteur 86: 76, 1954.
8. Lucentini, L. y Nazzaro, P.: *La reazione d'Middlebrook-Dubos nella lepra*. Ann. Italiani Dermat. et Sif. 9: 97, 1954.
9. Fukuda, D.: *Hemagglutination test by Middlebrook-Dubos in leprosy*. Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ. Series C. 6: 41, 1955.
10. Bojalil, L. F. y Zamora, A.: *Precipitin and skin test in the diagnosis of mycetoma due to Nocardia brasiliensis*. Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 113: 40, 1963.
12. Estrada-Parra, S., Calderón-Manes, S., Salazar-Mallén, M. y Amezcua, M. E.: *Isolation of a group-specific polysaccharide from tissues infected with Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr. 34: 294, 1966.
13. Estrada-Parra, S., Zamora, A. y Bojalil, L. F.: *Immunochemistry of the group specific polysaccharide of Nocardia brasiliensis*. J. Bact. 90: 571, 1965.
14. Yamamura, Y., Okada, Y., Nagamatsu, S. e Imada, T.: *The isolation from tuberculin of different polysaccharides having anaphylactic activity*. Amer. Rev. Resp. Dis. 91: 839, 1965.
15. Ouchterlony, O.: *Antigen-antibody reactions in gels*. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 26: 507, 1949.
16. Ruiz-Castañeda, M.: *Surface fixation. A new method of detecting certain immunological reactions*. Proc. Soc. Exp. Biol. 73: 46, 1950.
17. Ishizaka, K., Ishizaka, T., Lee, E. H. y Fundenberg, H.: *Immunochemical properties of human rA isohemagglutinin*. J. Immunol. 95: 197, 1965.
18. Levine, M., Chung-Hoon, E. K., Ichiriu, E., Arazaki, J. y Beatty, M.: *Serological response in various types an stages of Hansen's disease (leprosy) to tuberculin sensitized sheep red blood cells*. Int. J. Lepros. 20: 201, 1952.
19. Estrada-Parra, S. y Salazar-Mallén, M.: *Estudios inmunológicos en la lepra humana*. Salud Públ. México. 7: 437, 1965.

COMENTARIO OFICIAL

DR. JESÚS KUMATE¹

EL TRABAJO que presentan a esta Corporación el Dr. Mario Salazar Mallén y colaboradores, intitulado: *Estudios inmunológicos en la lepra*, constituye una aportación trascendente en el acervo de conocimientos no sólo en la lepra, sino en la metodología analítica inmunológica.

En efecto, proporciona información de índole cuantitativa en la respuesta inmunológica, que hasta ahora había sido estudiada mediante reacciones que aportan títulos o diluciones y que nada dicen, a pesar de los resultados numéricos, respecto a las magnitudes moleculares de los anticuerpos producidos.

Por otra parte, es muy significativo que haya adaptado una técnica inmunológica, de la cual un miembro de esta Corporación, el Maestro Ruiz Castañeda fue el inventor y que en los últimos años ha sido probada y adecuada en muchos campos de la Inmunología. Los resultados obtenidos, del orden de 1-20 o más ug/ml de N de anticuerpos, constituyen una demostración de la versatilidad del procedimiento que puede funcionar a esos niveles de sensibilidad y por otra parte, constituyen los primeros datos precisos de la respuesta inmune "natural" de la infección leprosa.

La mayor sensibilidad encontrada con el método cromatográfico de Ruiz Castañeda, en comparación con el de precipitación en

¹ Académico numerario. Hospital Infantil de México.