

prueba puede limitarse solo a 1 ó 2 concentraciones (sin excluir 10%).

7. Es conveniente fabricar muestras de suero con combinaciones 1:1 de diferentes lotes. Ello es particularmente útil cuando se va a pasar un hibridoma a crecer de un lote a otro; en este caso se recomienda mezclar ambos sueros 1:1 durante los primeros 2-3 días de cultivo, luego 0.5:1,5 para finalmente hacer el cambio.

REFERENCIA

- Köhler, G. (1981): *The technique of hybridoma production. Immunological Methods*, Vol. II, Eds. I. Lefkovits, B. Pernis. Academic Press, New York, pp. 285-298.

Jorge V. Gaviñondo Cowley
Departamento de Biología,
Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología,
29 y E, Vedado, La Habana 4, Cuba

* * *

Síntesis química de un antígeno para el diagnóstico de la lepra

Al editor:

La lepra es una enfermedad endémica en los países en vías de desarrollo. En el mundo existen más de 15 millones de enfermos; en Cuba la padecen 5 587 personas. Actualmente el problema fundamental consiste en poder diagnosticar la enfermedad lo antes posible pues desde el momento en que ocurre el contagio hasta que aparecen los síntomas, pueden pasar varios años.

El diagnóstico mediante el inmunoensayo confrontó la dificultad de la existencia de numerosos antígenos comunes a todas las micobacterias. En 1982 fue descubierto (Hunter y col., 1982) un glicolípido fenólico específico del *Mycobacterium leprae*, dos años más tarde fue sintetizado químicamente el determinante antigénico en busca de una sustancia más hidrosoluble para emplearla en el test. Con el derivado obtenido por síntesis química se evitó la necesidad de cultivar los gérmenes en el armadillo, animal en el que se logra su multiplicación.

La síntesis inicial del antígeno (Fujiwara y col., 1984; Gigg y col., 1984), tenía como dificultades fundamentales la complejidad del trabajo y, además, que el antígeno final estaba acoplado a BSA a través de una aminación reductiva con cianoborohidruro de sodio, lo que destruye una parte del determinante antigénico. Con el objetivo de evitar esas dos dificultades, nos propusimos diseñar un esquema de síntesis nuevo, más sencillo, que llevara al alil glicósido del determinante antigénico. Paralelamente a la terminación de nuestro trabajo, han aparecido otros métodos de síntesis del antígeno (Fujiwara y col., 1985; Chatterjee y col., 1985; Gigg y col., 1985).

Cartas al editor

La síntesis del determinante antigénico en forma de alil glicósido (5) consta de tres etapas fundamentales: *a*) síntesis del derivado de la glucosa (3); *b*) síntesis del derivado de la ramnosa (4); *c*) condensación de 3 y 4 para dar el disacárido que es desprotegido a 5.

La síntesis del derivado 3 se llevó a cabo a partir de glucosa por la siguiente secuencia de reacciones: reacción con acetona-ácido sulfúrico para obtener un derivado diisopropilidénico en las posiciones 1,2 y 5,6; metilación del grupo hidroxilo 3 libre e hidrólisis selectiva del grupo isopropilidénico de las posiciones 5 y 6 con ácido acético, obteniendo el derivado 1 con un rendimiento del 50 por ciento a partir de glucosa. El hidroxilo de la posición 6 es metilado selectivamente con diazometano-trifluoruro de boro para llegar al derivado 3,6 dimetilado, que es posteriormente hidrolizado, acetilado y tratado con ácido bromhídrico y ácido acético, obteniéndose el bromuro 3 activado por el carbono anomérico.

El derivado de la ramnosa 4 fue obtenido a partir del monosacárido en ocho etapas, que consisten en acetilación y glicosidación con alcohol alílico en presencia de tetracloruro de estaño; posteriormente el producto es desacetilado y tratado con acetona-ácido *p*-toluenosulfónico, que da el derivado 2. La benzoilación del hidroxilo 4 libre con cloruro de benzoilo-piridina y la hidrólisis del grupo isopropilidénico con ácido clorhídrico 1N en etanol es seguida por la metilación con diazometano-trifluoruro de boro y la debenzoilación con metóxido de sodio-metanol. El producto 4 es obtenido con 27 por ciento de rendimiento a partir de la L-ramnosa.

La condensación de 3 y 4 se realizó en una línea de alto vacío, utilizando cianuro de mercurio como catalizador y acetonitrilo como solvente; el disacárido obtenido en el 73 por ciento fue desacetilado con metóxido de sodio-metanol para llegar al disacárido libre en forma de alil glicósido (5).

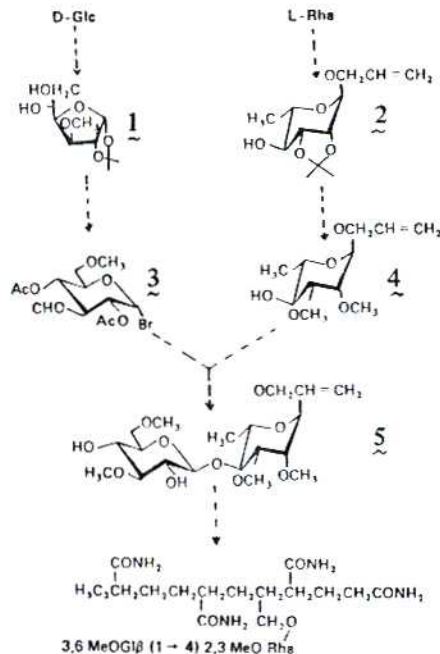


FIG. 1. Secuencia de reacción para la síntesis del antígeno y su copolimerización con poli(acrilamida).

Con el objetivo de obtener un antígeno macromolecular que se fijara bien en las placas empleadas para el método ELISA, **1** fue copolimerizado con acrilamida en presencia de persulfato de amonio y TMED, obteniéndose un copolímero soluble en agua que tiene un peso molecular de 100 000 D y un contenido de carbohidrato de 27 por ciento. El copolímero se fijó en placas de polivinilo y se desarrolló el ELISA según Cho y col. Para ello se emplearon sueros de pacientes de lepra multibacilar, de tuberculosis, de niños vacunados con BCG y de convivientes con pacientes de lepra. Se estimó que la concentración óptima del antígeno era de 0,045 $\mu\text{g}/\text{pozo}$, por lo que el trabajo se realizó con dicha concentración. Se realizaron determinaciones en paralelo con el antígeno sintetizado por Brenan y col., a concentraciones de 0,03 $\mu\text{g}/\text{pozo}$.

En la tabla 1 puede apreciarse que el copolímero sintético posee una alta sensibilidad, detectándose positividad en el 71,0 por ciento de los enfermos y 72,09 por ciento de los convivientes. Con respecto a los pacientes de tuberculosis y los niños vacunados con BCG, se puede ver una cierta positividad, aunque cabe destacar que los valores de densidad óptica obtenidos estaban discretamente por encima del valor límite establecido para nuestras condiciones.

Tabla 1
COMPARACION DE RESULTADOS EN DIFERENTES GRUPOS UTILIZANDO EL CONJUGADO ANTIGENO-BSA Y EL COPOLIMERO SINTETICO

Grupos	Conjug. pos/neg	%	Copol. pos/neg	%	Conjug. (media D. O. 492)	Copol.
Pacientes de lepra multibacilar	25/13	65,79	27/11	71,05	0,355 $\pm 0,424$	0,417 $\pm 0,424$
Convivientes	25/18	58,13	31/12	72,09	0,159 $\pm 0,069$	0,193 $\pm 0,082$
Pacientes tuberculosos	2/27	6,89	3/16	15,79	0,073 $\pm 0,044$	0,046 $\pm 0,058$
Niños vacunados con BCG	1/23	4,16	3/16	15,79	0,088 $\pm 0,018$	0,047 $\pm 0,044$

En la tabla 2 se expresan en forma asociativa los resultados obtenidos con ambos antígenos. Según dicha tabla, la sensibilidad es mayor (100%), sin embargo, la especificidad es menor (70%) para el copolímero. Esto pudiera estar asociado con una mayor fijación inespecífica a la matriz de poli(acrilamida). El coeficiente de correlación de Pearson, analizando todos los sueros, es (r) = 0,8218.

Como conclusión podemos señalar que se obtuvo el determinante antigénico del *Mycobacterium leprae* por síntesis química, mediante el empleo de un método original y se polimerizó con acrilamida, obteniéndose un antígeno artificial con sensibilidad mayor al del conjugado del antígeno con BSA y con una buena especificidad. El copolímero puede ser empleado a bajas concentraciones, lo que permite una alta productividad en su utilización y facilitará la introducción del método en nuestro país, de forma masiva, para estudios epidemiológicos en Lepra.

Tabla 2
SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD COMPARATIVA ENTRE EL CONJUGADO ANTIGENO-BSA
Y EL COPOLIMERO SINTETICO

	Copolímero		Total
	(+)	(-)	
Conjugados BSA (+)	50	0	50
(-)	9	21	30

Sensibilidad comparativa: Copolímero/conjugado, 100%

Especificidad comparativa: Copolímero/conjugado, 70%

REFERENCIAS

- CHATTERJEE, D.; J. T. DOUGLAS; S-N CHO; T. H. REA; R. M. GELBER; G. O. ASPINALL y P. J. BRENNAN (1985). *Synthesis of neoglycoconjugate containing the 3,6-di-0-methyl-β-D-glucopyranosyl epitope and use in serodiagnosis of leprosy*. Glycoconjugate J., 2: 187-208.
- CHO S-N.; T. FUJIWARA; S. W. HUNTER; T. H. REA; R. H. GELBER y P. J. BRENNAN (1984). *Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-0-methyl-β-D-glucopyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy*. J. Infect. Dis., 150: 311-322.
- FUJIWARA, T.; S. W. HUNTER; S-N. CHO; G. O. ASPINALL y P. J. BRENNAN (1984). *Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigen from leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy*. Infect Imm. 43: 245-252.
- HUNTER, S. W.; T. FUJIWARA y P. J. BRENNAN (1982). *The structure of the major specific glycolipid antigens of Mycobacterium leprae*. J. Biol. Chem., 257: 15072-15078.
- GIGG, R.; S. PAYNE y R. CONANT (1983). *The allyl group for protection in carbohydrate chemistry, part 14. Synthesis of 2,3-di-0-methyl-4-0-(3,6-di-0-methyl-β-D-glucopyranosyl): A haptenic portion of the major glycolipid from Mycobacterium leprae*. J. Carbohydr. Chem., 2: 207-223.
- GIGG, J.; R. GIFF; S. PAYNE y R. CONANT (1985). *Synthesis of propyl 4-0-(3,6-di-0-methyl-β-D-glucopyranosyl)-2,3-di-0-methyl-α-D-rhamnopyranoside*. Carbohydr. Res., 141: 91-97.

J. Mariño Albornas¹, V. Vérez Bencomo¹, L. González¹, C. S. Pérez¹,
F. González-Abreu Castell² y A. González Segredo²
1) Laboratorio de Química de los Carbohidratos,
Facultad de Química de la Universidad de La Habana y
Centro Nacional de Biopreparados, Ciudad de La Habana, Cuba
2) Laboratorio de Lepra, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

Correspondencia

Estimado editor:

Después de la aparición del artículo "CIBSOFT: Un paquete de programas para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas" en el número 3 del volumen 3 de esa Revista, hemos recibido algunas sugerencias de los usuarios de este sistema para su mejoramiento con vista a facilitar la manipulación de secuencias de ADN. En respuesta a dichas sugerencias se ha ampliado el editor permitiendo actualmente trabajar simultáneamente hasta con 5 secuencias y se han agregado opciones, tales como la búsqueda de un sitio que responda a un determinado patrón, el marcaje de segmentos de secuencias para su posterior manipulación y la inserción de un fragmento de una de las secuencias de trabajo previamente marcado o la secuencia complementaria invertida.

En próximos números presentaremos una información amplia y detallada sobre las nuevas opciones implementadas al CIBSOFT.

*Jorge Fernández de Cossío y Ricardo Bringas
Departamento de Computación
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
La Habana, Cuba*