

METODO ULTRAMICROANALITICO (ULTRAMICROELISA) PARA DETERMINAR ANTICUERPOS ANTI-INSULINA EN SUERO HUMANO

Gema García Dafonte , Ruben René González Pérez, Eduardo Cabrera Rode,
Roberto González Suárez

Instituto Nacional de Endocrinología, Hospital "Cmdte. Fajardo", Vedado, Habana 4, Cuba.

Recibido en abril de 1992. Aprobado en mayo de 1993.

Key words: Ultramicro analytic assay, ELISA, antibodies anti-insulin

SUMMARY

A rapid, reproducible ultramicro-enzyme linked immunosorbent assay (umELISA) for the detection of antibodies to insulin in serum was developed and characterized, to be used in the study of insulin-treated diabetic, non-insulin-dependent and recently diagnosed diabetic patients.

In this assay, the ligand is immobilized on a solid phase (ultramicroplates) and bound antibodies are detected by a human immunoglobulin antibody conjugated to alkaline phosphatase. As a final step, the enzyme activity bound to the immune complexes is measured after addition of the appropriate substrate. The umELISA requires only 10 μ l of sample and is completed in less than 3 hours.

Practical advantages of this assay include speed, sensitivity and reproducibility without needing radioisotopes and is recommended to be used for routine screening in a clinical laboratory.

This assay can also be used in more complex immunological studies.

RESUMEN

Se desarrolló y validó un ultramicroELISA (umELISA) para la detección de anticuerpos anti-insulina en suero con el objetivo de estudiar pacientes diabéticos tratados con insulina, no insulino dependientes y de reciente diagnóstico. En este ensayo los anticuerpos unidos al ligando inmovilizado en la fase sólida (ultramicroplacas) son detectados por la adición de un conjugado de anticuerpo anti-inmunoglobulina humana-fosfatasa alcalina. La actividad enzimática del inmunocomplejo se mide después de la adición del sustrato apropiado. El umELISA se realizó en menos de 3 horas y requiere solamente 10 μ l de muestra.

Entre las ventajas prácticas de este ensayo no isotópico se encuentran la rapidez, la sensibilidad, la reproducibilidad y puede ser utilizado para pesquisaje de rutina en laboratorio clínico. Por su especificidad este ensayo además puede ser empleado para estudios inmunológicos más complejos.

INTRODUCCION

La respuesta inmune a la insulina exógena fue descrita por vez primera en 1938 (Bauting *et al.*, 1938) y posteriormente estudiada, en términos más amplios, cuando se estandarizó un ensayo para detectar anticuerpos anti-insulina (AI) en pacientes diabéticos tratados (Berson y Yallow, 1959).

Los anticuerpos anti-insulina circulantes pueden producirse como respuesta a la terapia con insulina (AI) (Berson y Yalow, 1959; Kurtz y Nabarro, 1980) y como parte del proceso autoinmune que provoca la diabetes (AAI); estos últimos se han encontrado en el 32% de los pacientes tipo I (insulino-dependientes) antes del debut. Actualmente su determinación constituye parte del proceso de diagnóstico precoz y/o prevención de la enfermedad (Palmer *et al.*, 1983).

El principal objetivo de este trabajo fue el montaje y estandarización de un método inmunoenzimático rápido y simple para la detección de AI y AAI. El método utilizado es un ensayo inmunoenzimático en fase sólida, que se caracteriza por el uso de pequeños volúmenes de reactivos (10 μ l). Las muestras de suero se incubaron en placas de polivinilo recubiertas con

el antígeno (insulina humana o porcina) y la presencia de AI y AAI se reveló con un conjugado anti IgG humana- fosfatasa alcalina y su sustrato fluorogénico.

MATERIALES Y METODOS

Equipos

Se utilizó un analizador foto-fluorómetro-nefelómetro automático para lecturas discretas de fluorescencia, dispersión de la luz o transmisión en volúmenes de 8-300 μ l, SUMA 121b (marca registrada) y multipipeta computarizada de 96 puntas, ERIZO 101 (marca registrada). (Centro de Inmunoensayo, Habana, Cuba).

Reactivos

Se utilizó la insulina porcina de 80 UI (Actrapid MG, Novo, Dinamarca), insulina humana de 100 UI (Actrapid HM, Novo, Dinamarca) altamente purificadas y un conjugado comercial de fosfatasa alcalina - anti IgG humana obtenida de cabra (Sigma, EEUU). Como sustrato se empleó 4-metil-umbeliferil fosfato (Koch Light, Inglaterra). Los demás reactivos comunes fueron puros para análisis obtenidos de Merck.

Sueros controles

Como control positivo se trabajó con un pool de sueros de pacientes diabéticos tipo I con terapia insulínica. El control negativo se obtuvo de un pool de sueros de individuos no diabéticos, donantes de banco de sangre. Los controles fueron alícuotados y conservados a -20°C hasta su uso en el ensayo.

Tampones

Tampón A: fosfato-salino, 0.1 mol/l, pH 7.4 que contenía tween 20 (0.05%) y suero normal de carnero (5%) tratado 1 h a 56°C .

Tampón B: idéntico a tampón A, pero sin suero normal de carnero.

Muestras

Se ensayó un gran número de sueros de donantes de banco de sangre con edades entre 18 y 56 años, de ambos sexos ($n=200$), así como sueros de pacientes diabéticos tipo I con edad entre 5-18 años, con tratamiento insulínico ($n=25$) y de recién diagnóstico ($n=15$).

También se estudiaron 35 sueros de familiares de primer grado de diabéticos tipo I en un rango de edades entre 2 y 14 años, y diabéticos clasificados clínicamente como insulino no dependientes ($n=70$), separados en tratados con insulina ($n=19$) y tratados con hipoglicémico oral ($n=52$), cuyo rango de edad oscilaba entre 25 y 77 años, y con un tiempo de duración de la diabetes entre 1 y 35 años. Todas las muestras se conservaron a -20°C hasta ser analizadas.

Dilución de las muestras, controles y conjugado

Los sueros analizados y controles fueron diluidos 1:25 y el conjugado anti-IgG humana-fosfatasa alcalina 1:1500 con tampón A.

Estudios de inhibición

El estudio de inhibición se realizó adicionando insulina (humana o porcina) a sueros de diabéticos tipo I con tratamiento y de recién diagnóstico (debut), así como al control negativo. Las muestras fueron pre-incubadas 16 h a 4°C con igual dosis de insulina a la presente en la solución de recubrimiento y a dosis de 10 y 100 veces superiores (0 - 2,5 - 25 - 250 mUI de insulina/pozo).

Inmovilización de la insulina

Las soluciones de insulina porcina o humana en tampón carbonato-bicarbonato 0,1 mol/l, pH 9 a concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (0.1 $\mu\text{g}/\text{pozo}$ o 2.5 mUI/pozo) fueron inmovilizadas por adsorción sobre placas de cloruro de polivinilo (10 $\mu\text{l}/\text{pozo}$) durante 16 h a 4°C . Posteriormente las placas fueron lavadas 4 veces con 30 $\mu\text{l}/\text{pozo}$ de tampón B y estabilizados con BSA (1 $\mu\text{g}/\text{l}$) y sacarosa (0.14 mol/l), (González *et al.*, 1991).

METODOS

Procedimiento del ensayo

Se adicionaron 10 $\mu\text{l}/\text{pozo}$ de las muestras y controles diluidos en las placas recubiertas con insulina. Las placas fueron incubadas durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente se lavaron 4 veces, se secaron con papel no fluorescente y se le adicionaron 10 l/pozo del conjugado anti- IgG humana diluido. Las placas se incubaron nuevamente 1h a 37°C en cámara húmeda, se lavaron de igual forma y se les adicionaron 10 $\mu\text{l}/\text{pozo}$ de sustrato. Inmediatamente fueron incubadas 30 min a 37°C en cámara húmeda. La fluorescencia obtenida fue leída en el SUMA.

El índice UME (IUME) se definió como el cociente obtenido de la respuesta fluorescente del suero control negativo o muestras y la del control positivo.

Procesamiento estadístico

Los valores de IUME obtenidos para los sueros de donantes de banco de sangre fueron procesados por la opción Estadística Descriptiva del software Microstat, para el establecimiento del rango de valores de referencia.

El límite de valores negativos (no patológicos) del IUME, se calculó como la $x + 1.65$ DS de la distribución gaussiana (Thielmann, 1973).

RESULTADOS

Optimización de las condiciones del ensayo

El montaje y la estandarización del ultramicro-ELISA (umELISA) para la determinación de anticuerpos anti-insulina se realizó con insulina porcina y humana. Los mejores resultados se obtuvieron con las condiciones descritas (ver materiales y métodos), las cuales produjeron un método rápido, preciso y reproducible para la detección de AAI y AI de clase IgG.

Precisión

Los coeficientes de variación intraensayo ($n=20$) para las placas recubiertas con insulina porcina (IUME=0.15) y humana (IUME=0.13) fueron de 7% y 8%, y los interensayos ($n=10$),

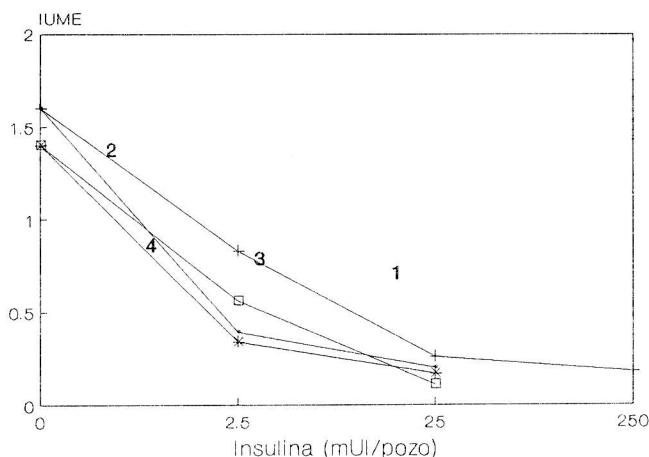


Fig. 1- Inhibición de los AAI en suero de un diabético tipo I de recién diagnóstico (debut). Incubación con dosis de insulina humana o porcina (16 horas, 4 °C), se añadió 10 μ l de suero pre-incubado a ultramicroplacas recubiertas con ambas insulinas. Ultramicroplaca recubierta con insulina porcina: Curva 1- Pre-incubación con insulina porcina. Curva 2- Pre-incubación con insulina humana. Ultramicroplaca recubierta con insulina humana: Curva 3- Pre-incubación con insulina porcina. Curva 4- Pre-incubación con insulina humana.

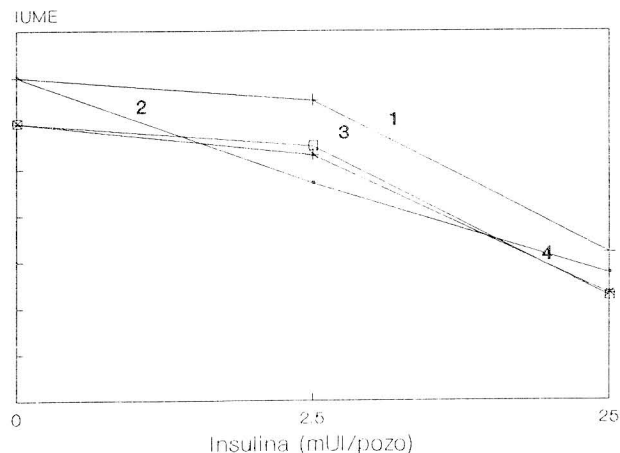


Fig. 2- Inhibición de los AI en suero de un diabético tipo I tratado con insulina exógena. Incubación con dosis de insulina humana o porcina (16 horas, 4 °C) se añadió 10 μ l de suero pre-incubado a ultramicroplacas recubiertas con ambas insulinas. Ultramicroplaca recubierta con insulina porcina: Curva 1- Pre-incubación con insulina porcina. Curva 2- Pre-incubación con insulina humana. Ultramicroplaca recubierta con insulina humana: Curva 3- Pre-incubación con insulina porcina. Curva 4- Pre-incubación con insulina humana.

de 16% y 15%, con valores de IUME de 0.11 y 0.12 respectivamente. Estos resultados son comparables a los reportados en otros ensayos (Dean *et al.*, 1989).

Rango de referencia

Los valores de IUME de los sueros de donantes de banco de sangre utilizando insulina porcina y humana adsorbida a la fase sólida, presentaron una distribución log-normal. El límite de valores negativos incluye el 90% de la distribución gaussiana. El ensayo con cualquiera de las insulinas empleadas dio un valor de IUME límite para la normalidad de 0,2.

Especificidad

La inmunoespecificidad del método se estudió por inhibición de los sueros de los diabéticos tipo I (tratados y no tratados), y el control negativo con diferentes dosis de insulina (ver materiales y métodos). La disminución de la fluorescencia obtenida es una medida de la inhibición, y la adsorción preferente de los anticuerpos a la insulina en la solución con respecto a la inmovilizada en la fase sólida demuestra la especificidad del ensayo. En el control negativo no se observó inhibición. La

figura 1 muestra la inhibición del suero de un paciente diabético tipo I antes de la terapia insulínica (debut); el valor del IUME (dosis cero) calculado fue mayor que 1.

La adición de insulina a dosis equivalentes o superiores a la del recubrimiento (2.5 mUI/pozo; 0.1 μ g/pozo) provocó inhibición evidente de los anticuerpos presentes en la muestra, obteniéndose la curva característica de pendiente negativa.

La inhibición típica en el caso de un paciente diabético tipo I (IUME1) con tratamiento insulínico (figura 2), se manifiesta a dosis 10 veces superiores en solución.

Índice UME en pacientes diabéticos

El análisis de los resultados de las muestras de diabéticos tipo I con tratamiento demostró que el 44% (11/25) presentó AI. En las muestras de diabéticos de reciente diagnóstico, el 60% (9/15) presentó AAI y se encontró el 23% (8/35) en familiares de primer grado de diabéticos insulino-dependientes.

Las muestras de diabéticos tipo II se estudiaron con insulina porcina adsorbida. En los tratados con hipoglicemiante oral, el 33% (17/51) fue detectado por el uMELISA, mientras que en los tratados con terapia insulínica se detectó el 52% (10/19).

La evaluación de los trastornos inmunológicos de la diabetes representa un aspecto importante en el estudio y prevención de la enfermedad. Entre estas alteraciones inmunológicas se encuentran la presencia de AAI y AI, que han sido incorporados cada vez más en los estudios de poblaciones con alto riesgo de padecer la diabetes y en la evaluación de la terapia aplicada (Zancheta *et al.*, 1987).

El umELISA estandarizado en este trabajo para la determinación de AI y AAI tiene como ventajas el poco consumo de reactivos, la rapidez, precisión y el no empleo de isótopos radiactivos.

Al igual que otros ELISA reportados, la frecuencia de los AI detectados por umELISA en diabéticos tipo I y tipo II con tratamiento insulínico no es tan elevada en comparación con los hallados por los métodos isotópicos (Wajchenberg *et al.*, 1986). Estos resultados coinciden con lo reportado por otros autores en cuanto a la desventaja del ELISA para detectar anticuerpos de alta afinidad presentes en diabéticos tratados (Sodoyez-Goffaux *et al.*, 1988).

En diabéticos tipo I (debut), los resultados coinciden con los encontrados por métodos isotópicos e inmunoenzimáticos (Zancheta *et al.*, 1987; Vardi *et al.*, 1987). No ocurrió así con los familiares de primer grado de diabéticos tipo I, en los cuales la frecuencia es mayor para los métodos inmunoenzimáticos (Ziegler *et al.*, 1989).

En diabéticos tipo II tratados con hipoglicemiantes orales se detectó el 33% de AAI; este valor es elevado cuando se compara con el 10% detectado en ELISA (Bodansky *et al.*, 1989). Probablemente, algunos de los AAI detectados por el umELISA, como ocurre generalmente en los ELISA, sean anticuerpos de baja afinidad producto de infecciones virales, de una reacción cruzada de los anticuerpos a un antígeno o de una configuración molecular común de determinados virus insulíntrópicos (Bodansky *et al.*, 1986), y no debido a una causa autoinmune de la destrucción de las células betas.

La aplicación de métodos rápidos y confiables, como el umELISA reportado en este trabajo contribuirá al estudio de estos trastornos inmunológicos pudiéndose evaluar una gran cantidad de muestras debido a las ventajas del SUMA, lo cual facilitará los estudios en poblaciones de riesgo diabético.

REFERENCIAS

- BAUTING, F. G.; W. R. FRANKS; W. R.; S. GAIRNS (1938). Physiological studies in metrazole shock. VII. Anti-insulin activity of insulin treated patients. *Am J Psychol* 95: 562- 564.
- BERSON, S. A.; R. S. YALOW (1959). Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. *J Clin Invest* 38: 1996-2016.
- BODANSKY, H. J.; H. TINDALL; D. E. PRICE; M. H. STICKLAND; K. GELSTHORPE; J. McNALLY; B.M. DEAN; G.F. BOTTAZZO y J.K. WALES (1989). Identification of secondary failure of oral hypoglycaemic therapy in patients with poor glycaemic control. *Diab Nutr Metab* 2: 193-197.
- BODANSKY, H. J.; B. M. DEAN; G. F. BOTTAZZO; P. J. GRANT; J. McNALLY; M. H. HAMBLING y J. K. WALES (1986). Islet cell antibodies and insulin autoantibodies in association with common viral infection. *Lancet* II; 1351-1353.
- DEAN, B. M.; J. M. McNALLY; E. BONIFACIO; A. M. JENNINGS; D. B. DUNGER; E. A. M. GALE y G. F. BOTTAZZO (1989). Comparison of insulin autoantibodies in diabetes - related and healthy populations by precise displacement ELISA. *Diabetes* 38: 1275- 1281.
- GONZALEZ, R. R.; R. ROBAINA; M. E. RODRIGUEZ y S. BLANCA (1991). An enzyme immunoassay for determining total thyroxine in human serum using an ultramicroanalytical system. *Clin Chim Acta* 197 : 159-170.
- KURTZ, A. B. y J. D. N. NABARRO (1980). Circulating insulin-binding antibodies. *Diabetologia* 19: 329-334.
- PALMER, J. P.; C. M. ASPLIN; P. CLEMONS; K. LYEN; O. TATPATI; P. K. RAGHU Y T. L. PAQUETTE (1983). Insulin antibodies in insulin-dependent diabetic before treatment. *Science* 222: 1337-39.
- SODOYEZ-GOFFAUX, F.; M. KOCH; N. DOZIO; D. BRANDENBURG y J.C. SODOYEZ (1988). Advantages and pitfalls of radioimmune and enzyme linked immunosorbent assay of insulin antibodies. *Diabetologia* 31: 694-702.
- THIELMANN, K. (1973). *Principios de metodología en bioquímica clínica*. La Habana: Instituto Cubano del Libro, 1974.
- VARDI P.; S. A. DIB; M. TUTTLEMAN; J. E. CONNELLY; M. GRINBERGS; A. RADIZABEH; J. M. RILEY; N. K. MACLAREN y G.S. EISENBARTH (1987). Competitive insulin autoantibody assay: prospective evaluation of subjects at high risk for development of type I diabetes mellitus. *Diabetes* 36:1286- 1291.
- WAJCHENBERG, B.L.; Y.G. THOMSEN; I.T. TOLEDO E SOUZA y O.A. GERMEK (1986). Comparison of insulin antibody levels during the first 3 years of treatment of adult diabetic with monocomponent porcine lente insulin and zgle peak beef NPH insulin. *Horm Metabol Res* 18: 535-539.
- ZANCHETA, R.; V. RUSSO; F. PRESOTTO; L. MAGRIN; B. PEDINI y C. BETTERLE (1987). Detection of insulin autoantibodies using an ELISA technique in first degree relatives of IDDM patients and in autoimmune patients. *Diab Res* 6:189-194.
- ZIEGLER, A. G.; ZIEGLER, R.; JACKSON, R. A. AND EISENBARTH, G.S. (1989). Testing the linear destruction hypothesis in type I diabetes. En: *The Joslin study. Immunotherapy of type I diabetes*. Edited by D. Andreani, H. Kold, P. Pozzilli, John Wiley and Sons LTD, Chapter 15 : 155-176.