



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

INTERFERENCIA ENDOGENA POR FACTOR REUMATOIDE  
EN LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENO  
AVIARIO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**  
P R E S E N T A :  
MA. MARIANA TELLEZ ARAIZA



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

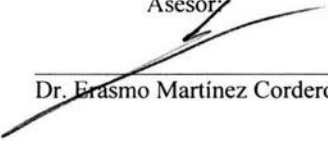
## JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. RODOLFO PASTELÍN PALACIOS  
Vocal: Prof. JOSÉ SULIVAN LÓPEZ GONZÁLEZ  
Secretario: Prof. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO  
1er. Suplente: Prof. LAURA PENÍCHE VILLALPANDO  
2º. Suplente. Prof. CLAUDÍA HUESCA GÓMEZ

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Biología Celular y Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Asesor:

  
Dr. Erasmo Martínez Cordero

Supervisor técnico:

  
M.I.B.B. Diana Elodia Aguilar León

Sustentante:

  
Ma. Mariana Téllez Araiza

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Dr. Erasmo Martínez por la oportunidad de desarrollar el siguiente trabajo, por haberme brindado su tiempo, conocimiento y por toda su ayuda.

A M.I.B.B. Diana Aguilar por toda la comprensión y apoyo que siempre me ha brindado.

Al Dr. José Salivan López por su ayuda y enseñanza.

Al Dr. Rodolfo Pastelín por su paciencia y comprensión

A todo el Jurado asignado para éste trabajo

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de ser parte de ella.

A todos los profesores que formaron parte de mi desarrollo profesional.

## **DEDICATORIAS:**

**A DIOS:**

Por haberme permitido lograr éste sueño.

**A MI HERMANA:**

Por su apoyo y ayuda incondicional.

**A MI MAMA:**

Por su esfuerzo y lucha constante.

**A MIGUEL:**

Por su tiempo, comprensión y ayuda para la realización de éste trabajo.

**A DIEGO:**

Por su alegría y cariño.

**A Elvira y Carlitos :**

Por su cariño.

**A MIS AMIGAS:**

Jacqueline, Norma, Lety, Emma, Judith, Adriana y Tania

**A Maggy, Juanita y Ma. Elena:**

Por su amistad y toda su ayuda para terminar éste trabajo.

**A LA UTM DE INCMNSZ:**

Por su amistad a Caro, Paty, Gaby, Tere, y Pili

## CONTENIDO

	Página
1. Resumen .....	7
2. Antecedentes.....	8
2.1 Neumonitis por hipersensibilidad .....	8
2.2 Interferencias en inmunoensayos .....	10
2.2.1 Reactividad cruzada .....	11
2.2.2 Anticuerpos endógenos .....	12
2.2.3 Antígenos enmascarados .....	12
2.2.4 Mecanismo indicador .....	13
2.2.5 Efecto matriz .....	13
3. Justificación .....	14
4. Objetivo .....	14
4.1 Objetivos particulares .....	14
5. Hipótesis .....	14
6. Metodología .....	15
6.1 Grupo de estudio .....	15
6.2 Determinación de AAA .....	16
6.3 Estudio de efecto de interferencia .....	18
6.4 Detección de anticuerpos endógenos .....	19
6.4.1 Estudio de los anticuerpos IgG anti-IgM y anti-IgA .....	19
6.4.2 Estudio de los anticuerpos IgA anti-IgG y anti-IgM .....	19
6.4.3 Estudio de los anticuerpos IgM anti-IgG y anti-IgA .....	20
6.5 Determinación de IgM con actividad de factor reumatoide .....	21
6.6 Efecto de factor reumatoide purificado .....	22
6.7 Comparación con artritis reumatoide .....	23
6.8 Inmunoblot .....	23
6.9 Estudio del antígeno .....	24
7. Análisis estadístico .....	24
8. Resultados .....	25
8.1 Anticuerpos contra antígeno aviario .....	25
8.2 Evaluación de la interferencia .....	27
8.3 Resultados de los anticuerpos IgG con actividad anti-IgM y anti-IgA anticuerpos IgA con actividad anti-IgG y anti-IgM y anticuerpos IgM anti-IgG y anti-IgA .....	29
8.4 Resultados IgM con actividad de factor reumatoide .....	30

8.5 Pruebas de reacción cruzada e interacción con otras inmunoglobulinas .....	32
8.6 Estudio del antígeno y condiciones de interferencia .....	33
8.7 Resultados de inmunoblot .....	34
9. Aspectos clínicos .....	35
10 Discusión .....	35
11. Conclusiones .....	40
12. Bibliografía .....	41
13. Anexos .....	47

## 1.RESUMEN

La determinación de anticuerpos contra antígeno aviario (AAA) ha sido de utilidad al estudiar la neumonitis por hipersensibilidad (NH), principalmente cuando se realizan inmunoensayos cuantitativos.

Se busco identificar si la presencia de anticuerpos endógenos en NH puede generar algún tipo de interferencia durante el estudio de AAA por ELISA.

Se estudiaron 59 pacientes con NHAA, 80 controles sanos (CS) y 47 contactos asintomáticos (CA). Los AAA se determinaron mediante ELISA. La interferencia endógena se evaluó separando la IgG por cromatografía. El descenso de los AAA clase IgM fue compatible con un resultado falso-positivo, y se estudiaron las causas de este efecto. Se evaluó especialmente la IgM con actividad de factor-reumatoide (FR). La reacción-cruzada contra AA se evaluó en 25 pacientes con artritis reumatoide (AR). La unión IgM-IgG se detectó por inmunoblot. El análisis estadístico incluyó la prueba U de Mann-Withney.

El 47.4% de los pacientes con NH presentaron AAA superando los valores de referencia de CS y CA. Los AAA clase IgM descendieron (34-84%) al eliminar la IgG por cromatografía. La IgM con actividad de FR fue positiva en NH (60.7 y 64.2%) respecto a los CS y CA ( $P= 8 \times 10^{-10}$ ,  $6 \times 10^{-10}$ ). Los AAA fueron negativos en AR. El FR purificado reprodujo el efecto falso-positivo. La unión IgM-IgG fue positiva por inmunoblot.

Se han descrito diferentes factores causantes de interferencias durante la evaluación serológica en la NH. Al estudiar si la presencia de anticuerpos endógenos podría interferir en la detección de AAA, identificamos que una IgM con actividad de FR generó resultados falsos-positivos.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Neumonitis por hipersensibilidad

La neumonitis por hipersensibilidad (NH) es una neumopatía muy frecuente que forma parte de un grupo de entidades conocidas como enfermedades intersticiales pulmonares. Cuando esta ocurre a consecuencia de la exposición con aves se denomina NH por antígeno aviario (AA) (1,2).

A pesar de que el diagnóstico depende fundamentalmente de distintas manifestaciones clínicas, cambios funcionales respiratorios, así como de algunos hallazgos radiológicos y patológicos, el estudio inmunológico ha sido de gran importancia para comprender su fisiopatogenia e identificar marcadores serológicos que puedan ser de utilidad en el estudio clínico de la enfermedad.

Aunque los primeros reportes de anticuerpos contra antígeno aviario (AAA), especialmente con pruebas cualitativas, revelaron que estos marcadores podrían estar presentes en contactos sanos sin enfermedad, un número creciente de estudios ha descrito que las diferencias entre NH y controles dependen principalmente de los niveles de anticuerpos. De acuerdo a distintos reportes, la detección de niveles altos de AAA en el suero de pacientes con NH ha sido útil como apoyo diagnóstico cuando se analiza en el contexto de otras anomalías de tipo clínico, radiológico, funcional ó histopatológico.

Por otro lado, algunos autores han sustentado también que los AAA pueden diferenciar a la NH de otras enfermedades intersticiales pulmonares (3-7). Además, la determinación cuantitativa y seriada de los AAA ha permitido tener una noción más clara sobre la evolución de la enfermedad, incluyendo algunos cambios importantes después de suspender la exposición al antígeno ó una vez que se instaura el tratamiento médico (5,8). También se

ha tratado de establecer una relación entre las anomalías serológicas y el curso clínico y algunos trabajos registran la aparición de valores altos de AAA de la clase IgM durante la fase aguda de la enfermedad, así como la fluctuación de estas inmunoglobulinas de la clase IgG e IgA a través de las diferentes etapas del seguimiento clínico de la NHAA (3-5,9).

La identificación de AAA particularmente en títulos altos puede verse afectada por distintas condiciones tanto clínicas, como en los métodos de detección de estos marcadores. Esto puede causar serias dudas respecto a su valor real en el diagnóstico, ó producir interpretaciones erróneas de los resultados, cuya implicación práctica es especialmente relevante, ya que al igual que en otras entidades patológicas una apreciación incorrecta de las pruebas de apoyo al diagnóstico puede derivar en intervenciones terapéuticas y quirúrgicas innecesarias (10)

En la NHAA tanto las características clínicas, como algunas condiciones inherentes de los inmunoensayos que se utilizan en la detección de AAA pueden generar resultados falsos positivos ó falsos negativos (11-13). Las diferencias en los niveles de AAA pueden ser explicadas debido al tiempo e intensidad de exposición al antígeno, el tabaquismo y la presencia simultánea de otras enfermedades, así como a la variabilidad en las fases de la enfermedad (14) mientras que la influencia de diversas condiciones metodológicas durante el estudio de los AAA en distintos inmunoensayos, puede ocasionar interferencias importantes al evaluar estas anomalías inmunológicas.

En la literatura hay datos previos que indican que un efecto de prozona (12,15,16), la presencia de heteroanticuerpos (12,17,18) y algunos contaminantes como el ácido teicoico (19) pueden causar interferencias en la detección de AAA. También se ha descrito que la reactividad cruzada de AAA contra algunos grupos sanguíneos y el reconocimiento de

proteínas derivadas de otras aves (20,21), así como algunos analitos naturales pueden causar efectos falsos positivos (13).

## **2.2 Interferencias en inmunoensayos**

El diccionario de la lengua española define interferencia como: cruzar ó interponer algo en el camino de una cosa ó de una acción. Desde el punto de vista del laboratorio, se puede definir a la interferencia como la condición que ocasiona inexactitud en el resultado de una prueba determinada (22).

Los efectos nos pueden generar resultados falsos negativos ó falsos positivos al realizar diferentes pruebas de laboratorio y pueden ocurrir tanto en determinaciones manuales como en las automatizadas, prácticamente en cualquier área analítica, como en la determinación de fármacos, uroanálisis, hematología, e inmunoensayos entre otras.

Las interferencias que se conocen comúnmente en la mayoría de los métodos analíticos son las relacionadas con las condiciones de la muestra como la lipemia, ictericia y hemólisis. Sin embargo, existen otros factores que pueden participar en la alteración de los resultados, dependiendo del tipo de pruebas de laboratorio que se apliquen (23).

En el caso de los inmunoensayos, la interferencia esta sujeta a la concentración del analito que tenga la muestra entre otros factores y puede depender de distintas condiciones que se aplican en su realización, sin embargo en muchas ocasiones es difícil detectar las interferencias ya que no siempre se conoce la concentración real del analito.

Las condiciones del paciente, como la presencia de enfermedades hepáticas y renales pueden explicar los resultados alterados debido a que son los principales órganos de excreción y metabolismo y las principales moléculas de interferencia son los metabolitos.

Generalmente las interferencias se presentan en inmunoensayos cuantitativos, aunque también puede aplicarse a pruebas cualitativas (22). Estas interferencias han sido clasificadas de acuerdo a algunos autores en:

- REACTIVIDAD CRUZADA.
- ANTICUERPOS ENDÓGENOS
- ANTÍGENOS ENMASCARADOS
- MECANISMO INDICADOR
- EFECTO MATRIZ

### **2.2.1 Reactividad cruzada**

Esta forma de interferencia se presenta cuando participan moléculas con estructuras similares, lo cual puede ocurrir principalmente a nivel de los epitopos. Estas estructuras pueden unirse a un mismo anticuerpo como ocurre en el caso de las isoformas de proteínas que derivan de su degradación y que tienen múltiples estructuras similares (22, 24).

La reactividad cruzada también se presenta en analitos heterogéneos y en metabolitos de estructuras similares.

En drogas la interferencia por reactividad cruzada más común es en metabolitos de estructura similar como ciclosporina A, fenobarbital y pentobarbital.

Al usar anticuerpos monoclonales la interferencia puede disminuir pero no desaparecer, debido a que moléculas de estructura similar pueden competir por la unión a epitopos.

### **2.2.2 Anticuerpos endógenos (heterofilicos)**

El concepto de los anticuerpos heterofilicos, se aplica a un grupo de anticuerpos polireactivos endógenos que reaccionan con una amplia variedad de antígenos.

Recientemente éstos anticuerpos que interfieren en inmunoensayos han sido llamados heteroanticuerpos e incluyen anticuerpos idiotípicos y factor reumatoide (22, 23).

Los primeros estudios mostraron que los anticuerpos heterofilicos eran un grupo de IgM (22). La información con respecto a la naturaleza de los anticuerpos sigue en estudio. Los heteroanticuerpos son más difícil de identificar o de remover ya que éstos son anticuerpos polireactivos de origen endógenos y no tienen una reactividad definida debido a que los inmunógenos pueden variar de individuo a individuo y estos heteroanticuerpos pueden reaccionar con distintas porciones de inmunoglobulinas de diferente especie.

Los anticuerpos poliespecíficos son aquellos que reaccionan con una gran variedad de antígenos, similares en composición química, peso ó carga; son anticuerpos que tienen sitios de combinación múltiple para la región variable y puede unirse a diferentes tipo de antígeno (22, 24).

Los anticuerpos que reciben el nombre de factor reumatoide son aquellos que se unen a diferentes determinantes antigénicos en la fracción Fc de IgG. Pueden generarse a partir del segmento del gen V ó puede ser generado como un anticuerpo antiidiotípico.

### **2.2.3 Antígenos enmascarados**

Este tipo de interferencia ocurre debido al resultado que producen antígenos ocultos o enmascarados, que pueden estar presentes en el mismo analito o en los componentes utilizados al realizar diferentes inmunoensayos. Por ejemplo en la determinación de

apolipoproteína A-I se ha observado que la actividad inmunológica aumenta cuando se trata con detergentes puesto que la lipoproteína puede estar en diferentes formas dependiendo de su composición lipídica y el tratamiento con detergentes desenmascara algunos epítopes (22).

#### **2.2.4 Mecanismo indicador**

Estas se refieren a las interferencias que pudieran existir debido al equipo de medición utilizado en los inmunoensayos, incluyendo diferentes tipos de lectores o mecanismo de detección de la reacción inmune. Por ejemplo, los lectores que detectan el complejo antígeno-anticuerpo en ELISA. Una interferencia frecuente hasta hace unos años es aquella debida al tratamiento con administración de radioisótopos, lo que puede causar falsos positivos al usar RIA debido que las muestras de suero y orina tienen emisión de fotones que pueden ser detectados por contadores gama o beta, o incluso mediante quimioluminiscencia (23,24).

#### **2.2.5 Efecto matriz**

Incluyen cualquier cosa presente en la muestra excepto el analito. Estas interferencias en la actividad de un analito es debido a las interacciones ajenas al analito que pueden depender del pH, concentración del medio, temperatura, etc.

### **3. Justificación**

Debido a que se ha propuesto que la presencia simultánea de AAA de las clases IgM, IgG y/o IgA en títulos altos puede ser de utilidad en estudio clínico de la NH, es importante identificar la presencia de factores que potencialmente puedan generar algún tipo de interferencia y establecer si dichas condiciones pueden causar resultados falsos positivos o falsos negativos.

### **4. Objetivo general:**

Estudiar si existe alguna interferencia al determinar los niveles de AAA en pacientes con NH quienes presentan más de una clase de inmunoglobulina con esta especificidad

#### **4.1 Objetivos particulares:**

- a) Evaluar que tipo de interferencia puede afectar la detección apropiada de los AAA mediante un método de ELISA.
- b) Conocer la importancia de dichas interferencias en inmunoensayos cuyo objetivo sea apoyar el diagnóstico clínico y seguimiento de pacientes con NH.

### **5. Hipótesis:**

Si se presenta un efecto competitivo durante el reconocimiento del AA por diferentes clases de inmunoglobulinas, puede dar lugar a un efecto de interferencia endógeno generando resultados falsos positivos ó falsos negativos al determinar los niveles de dichos anticuerpos mediante ELISA.

## **6. Metodología**

### **6.1 Grupos de estudio**

Se estudiaron 59 pacientes consecutivos (49 mujeres y 10 hombres, con un promedio de edad de 46.9 años) con NHAA. Todos ellos reunieron los criterios de diagnóstico para esta enfermedad de acuerdo a reportes anteriores y mostraron pruebas positivas de AAA por Ouchterlony y/o ELISA (2,3).

Se incluyeron a 80 donadores sanos (71 mujeres y 9 hombres, edad promedio de 36.7 años) sin antecedentes de contacto con aves. Estos voluntarios fueron estudiados con anterioridad para poder excluir cualquier enfermedad pulmonar. Ninguno de estos controles mostró pruebas funcionales respiratorias anormales ó hallazgos clínicos y radiológicos sugerentes de enfermedad pulmonar.

También se estudiaron a 47 individuos clasificados como contactos asintomáticos sin neumonitis (43 mujeres, 4 hombres con edad promedio de 38.2 años) quienes fueron seleccionados a partir de un grupo de donadores sanos con historia previa de exposición a antígenos, comparable con la del grupo de NHAA. No se encontraron datos compatibles con enfermedades pulmonares mediante historia clínica, examen físico, pruebas funcionales y estudio radiológico en estos sujetos.

Como se señala más adelante, fue necesario incorporar en el estudio a un grupo de 25 pacientes (20 del sexo femenino y 5 del sexo masculino, con un promedio de edad de 47.1 años) con artritis reumatoide. Todos ellos satisfacían los criterios de diagnóstico del Colegio Americano de Reumatología (25) y presentaron resultados positivos para FR mediante pruebas de aglutinación con látex.



En cada uno de los participantes del estudio se obtuvo una muestra de sangre periférica por venopunción y después de separar el suero se conservaron alicuotas a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Revco, Scientific, Inc. Asheville, NC, USA) hasta su uso.

Este estudio se realizó una vez que recibió la aprobación de las Comisiones de Investigación y Bioética del INER.

## **6.2 Determinación de AAA**

La identificación de precipitinas contra antígeno aviario fue realizada por el método de Ouchterlony. Antes de realizar este procedimiento, se optimizó y estandarizó la técnica de acuerdo a reportes anteriores (3).

Los AAA se evaluaron por ELISA una vez que se estandarizaron y optimizaron las condiciones para identificar IgM, IgG e IgA (2,3,17). Se utilizaron placas para ELISA (Maxisorb, NUNC, Roskilde Denmark), las cuales fueron cubiertas con  $100\ \mu\text{l}$  de antígeno aviario estéril ( $12\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ) en amortiguador de carbonatos ( $0.05\ \text{M}$ ). Después de incubar por  $12\ \text{h}$  se lavaron 5 veces con amortiguador salino de fosfatos (ASF)-Tween 20 ( $0.05\%$ ) y se bloqueó con albúmina sérica bovina fracción V (ASB) al  $1\%$  (Sigma Co., USA). Se realizaron 5 lavados con ASF Tween 20 al  $0.05\%$ . Se agregaron las muestras de los pacientes y controles previamente deplementadas ( $56^{\circ}\text{C}$ ,  $20\ \text{min}$ ) y se incubó  $1\ \text{h}$  a  $37^{\circ}\text{C}$ .

La unión de los AAA con el antígeno fue detectada usando diluciones óptimas de anticuerpos de cabra anti IgM, IgG e IgA humanas marcados con peroxidasa (Sigma Co., USA). Para todas las clases de inmunoglobulinas se usó el fragmento  $\text{F}(\text{ab}')_2$  con el fin de evitar la posibilidad de agregación inespecífica entre las porciones  $\text{F}_c$  del anticuerpo del

paciente y las inmunoglobulinas marcadas ó la interacción de la fracción F(ab')<sub>2</sub> el suero del suero del paciente con la Fc del anticuerpo de detección. Como sustrato se utilizó ortofenilendiamina (OFD) (Sigma Co., USA), la cual fue preparada en amortiguador de citratos (0.1M pH 5.0) conteniendo peróxido de hidrógeno. Se incubó 15 min. a temperatura ambiente y posteriormente se adicionaron 50 µl de ácido sulfúrico 2.5 N para detener la reacción. Los resultados fueron registrados en unidades de densidad óptica (UDO) a 492 nm con un lector de ELISA (Labsystem, Finland). Cada suero se estudió por duplicado y se incluyeron controles positivos y negativos en cada placa.

La unión de los AAA fue confirmada por inmunoblot (3). Se utilizó un acúmulo de suero de paloma estéril (12 µg/pozo) el cual fue separado en SDS-PAGE (10%) bajo condiciones reductoras de acuerdo a la técnica de Laemmli (26). La proteína fue transferida a membranas de nitrocelulosa y bloqueada con ASB al 1% (Sigma Co., USA) en ASF (27). El suero de los pacientes se incubó 3 h a 37°C. Se lavó cada tira de nitrocelulosa 5 veces con ASF-Tween 20 (1%) y la reacción de AAA fue detectada agregando una dilución óptima de inmunoglobulinas (fragmento F(ab')<sub>2</sub>) antihumanas de cabra marcadas con peroxidasa (Sigma Co., USA). Los resultados fueron comparados con un marcador de peso molecular (Bio-Rad Richmond, USA).

La especificidad de las pruebas de ELISA e inmunoblot para la detección de AAA fue realizada de acuerdo a reportes previos (3,28) Al usar dichas pruebas en trabajos anteriores se ha establecido que los sueros de pacientes con NH con AAA no presentan reactividad cruzada en la que participen antígenos humanos similares a antígenos aviarios.

### **6.3 Estudio de efecto de interferencia**

Para identificar la posible interferencia producida por los niveles altos de las diferentes clases de AAA, se decidió separar la porción IgG del suero total por medio de la absorción en cromatografía de afinidad, utilizando una columna de sepharosa CL-4B-con proteína A (Sigma Co., USA). Se incubaron los sueros en la columna por 3 hrs a 4 °C. Las fracciones eluidas y retenidas fueron recolectadas. La fracción IgG fue recuperada en un amortiguador de glicina-HCl (0.1M, pH 2.8) y neutralizadas con Tris 1.0 M, pH 8.5. Todas las fracciones fueron dializadas con ASF (0.01M, pH 7.2) y concentradas al volumen original (Amicón, USA). Se aplicaron las mismas condiciones a las muestras controles empleando sepharosa CL-4B sin proteína A.

Debido a que la eliminación de IgG por cromatografía de afinidad en los sueros con NHAA afectó principalmente las pruebas de AAA de clase IgM y en menor proporción a la IgA, se consideró que una interacción entre la IgG e IgM ó IgG e IgA podrían participar en la interferencia de las pruebas para detectar los AAA. Por esta razón se estudiaron las siguientes alternativas a) Que la IgG de los pacientes tuviera actividad anti-IgM y anti-IgA; b) Que la IgA presentara capacidad de unirse a la IgG e IgM; y C) Que la IgM tuviera reactividad anti-IgG y anti-IgA.

En esta fase del estudio se realizó un experimento adicional, consistente en la reconstitución de las fracciones sin IgG obtenidas por cromatografía, con IgG humana con y sin actividad de AAA para evaluar los resultados de AAA por ELISA

## **6.4 Detección de anticuerpos endógenos**

### **6.4.1 Estudio de los anticuerpos IgG anti-IgM y anti-IgA**

La IgM e IgA purificadas (Sigma Co., USA) (60 µg/ml) fueron inmovilizados en placas de poliestireno (Maxisorb, NUNC, Denmark) con amortiguador de carbonatos por 12 h a 37°C. Se realizan 5 lavados con ASF-T al 0.05% y se bloquea con ASB al 1% (Sigma Co., USA) Se realizaron 5 lavdos y los sueros de los pacientes y controles fueron diluidos en ASF-T al 0.05% e incubados por 1 h a 37°C. La unión específica de la IgG contra IgM e IgA fue detectada adicionando una dilución óptima de anticuerpos de cabra contra IgG humana marcada con peroxidasa (Sigma Co., USA). En estos experimentos se utilizó también el fragmento F(ab')<sub>2</sub> para evitar causas adicionales de interferencia, como la agregación inespecífica o la interacción de los anticuerpos de los pacientes con NH con las inmunoglobulina marcada. La OFD (Sigma Co., USA). fue preparada en amortiguador de citratos (0.1 M pH 5) y peróxido de hidrógeno para usarla como sustrato y deteniendo la reacción con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N. Los resultados se registraron en unidades de densidad óptica (UDO) a 492 nm usando un lector de ELISA (Labsystem, Finland). Los valores de referencia fueron obtenidos a partir de los sujetos sanos.

### **6.4.2 Estudio de los anticuerpos IgA con actividad anti-IgG y anti-IgM**

La IgG e IgM purificadas (Sigma Co., USA) (60 µg/ml) fueron inmovilizados en placas de poliestireno (Maxisorb, NUNC, Denmark) con amortiguador de carbonatos por 12 h. Se realizaron 5 lavados con ASF-T al 0.05% y se bloqueo con ASB al 1% (Sigma Co., USA) . Se realizaron 5 lavados con ASF-T al 0.05% y los sueros de los pacientes y controles

fueron diluidos en ASF-T al 0.05% e incubados por 1 h a 37°C. La unión específica de la IgA contra IgG e IgM fue detectada adicionando una dilución óptima de anticuerpos de cabra contra IgA humana marcada con peroxidasa (Sigma Co., USA). En estos experimentos se utilizó también el fragmento F(ab')<sub>2</sub> para evitar causas adicionales de interferencia, como la agregación inespecífica o la interacción de los anticuerpos de los pacientes con NH con las inmunoglobulina marcada. La OFD (Sigma Co., USA). fue preparada en amortiguador de citratos (0.1 M pH 5) y peróxido de hidrógeno para usarla como sustrato y deteniendo la reacción con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N. Los resultados se registraron en unidades de densidad óptica (UDO) a 492 nm usando un lector de ELISA (Labsystem, Finland). Los valores de referencia fueron obtenidos a partir de los sujetos sanos.

#### **6.4.3 Estudio de los anticuerpos IgM con actividad anti-IgG y anti-IgA**

La IgG e IgA purificadas (Sigma Co., USA) (60 µg/ml) fueron inmovilizados en placas de poliestireno (Maxisorb, NUNC, Denmark) con amortiguador de carbonatos por 12 h. Se lavaron 5 veces y se bloqueo con ASB al 1% (Sigma Co., USA) Se realizaron 5 lavados y los sueros de los pacientes y controles fueron diluidos en ASF-T al 0.05% e incubados por 1 h a 37°C. La unión específica de la IgM contra IgG e IgA fue detectada adicionando una dilución óptima de anticuerpos de cabra contra IgM humana marcada con peroxidasa (Sigma Co., USA). En estos experimentos se utilizó también el fragmento F(ab')<sub>2</sub> para evitar causas adicionales de interferencia, como la agregación inespecífica o la interacción de los anticuerpos de los pacientes con NH con las inmunoglobulina marcada. La OFD

(Sigma Co., USA) fue preparada en amortiguador de citratos (0.1 M pH 5) y peróxido de hidrógeno para usarla como sustrato y deteniendo la reacción con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N. Los resultados se registraron en unidades de densidad óptica (UDO) a 492 nm usando un lector de ELISA (Labsystem, Finland). Los valores de referencia fueron obtenidos a partir de los sujetos sanos.

### **6.5 Determinación de IgM con actividad de factor reumatoide**

Debido a que la única interacción que se observó entre los tres tipos de inmunoglobulinas fue entre de IgM con IgG, y como éste tipo de interacción de una IgM que reconoce una IgG se conoce como actividad de factor reumatoide se decidió nombrar de esta manera a ésta prueba, realizándose la determinación de estos anticuerpos con actividad de factor reumatoide. Estos anticuerpos fueron detectados usando un método inmunoenzimático de acuerdo a trabajos anteriores (28). Las microplacas (Maxisorb, NUNC, Denmark) fueron sensibilizadas con 100 µl de IgG humana tanto monomérica como agregada (60 µg/ml) (63°C) en amortiguador de carbonatos. Después de incubar 12 h los pozos fueron lavados con ASF-T y bloqueados con ASB al 1%. Se realizan 5 lavados y los sueros de los pacientes se incubaron por 1 h a 37°C. La unión de la IgM a los pozos sensibilizados con IgG fue detectada usando una dilución óptima de anticuerpos anti-IgM humana (fragmentos F(ab')<sub>2</sub>) marcada con peroxidasa para evitar la interacción del FR con la porción Fc. El sustrato OFD (Sigma Co., USA) se preparó con amortiguador de citratos y la reacción se detuvo con 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 N. Los resultados fueron registrados en unidades de densidad óptica (UDO) a 492 nm con un lector de ELISA (Labsystem, Finland).

Para estudiar si los sueros que mostraron resultados sugerentes de pruebas falsas positivas para AAA presentaban inmunoglobulinas IgM con actividad anti-IgA, se realizó una variante del ELISA para el FR usando IgA tanto monomérica como agregada (60 µg/ml) (63°C) como antígenos. La presencia de ésta interacción fue estudiada en todas las muestras y en la fracción exenta de IgG obtenida por cromatografía de afinidad. También se estudio el efecto de la IgM purificada con actividad de FR una vez que fue adicionada a las muestras con niveles altos de AAA de clase IgA. La IgM purificada sin actividad de FR se incluyó como control. Los mismos estudios se realizaron en las fracciones depletadas de IgG.

En estos estudios se incluyó al grupo de 25 pacientes con artritis reumatoide seleccionados en base en los criterios de diagnóstico aceptados internacionalmente (25) con resultados positivos para FR mediante pruebas de aglutinación con látex. Los valores de referencia fueron obtenidos usando las muestras de sueros de los controles sanos y contactos asintomáticos sin NH. También se incluyeron como controles a la IgM, IgG e IgA puras (Sigma Co., USA) y a una muestra previamente purificada conteniendo IgM con actividad de FR.

#### **6.6 Efecto de factor reumatoide purificado**

Se realizaron experimentos adicionales usando un purificado de FR que fue obtenido por cromatografía de afinidad (Sephacosa CL-4B activada acoplada con IgG humana purificada) a partir de un acúmulo de sueros de los 25 pacientes con artritis reumatoide que presentaron FR positivo. Se usaron concentraciones crecientes de estas inmunoglobulinas

comparables con la cantidad presente en los sueros de los pacientes con NHAA, las cuales fueron adicionadas a las muestras con niveles altos de AAA de clase IgG, ó a la fracción IgG separada por cromatografía a fin de evaluar los cambios de los niveles de IgM, IgG e IgA contra el antígeno aviario por ELISA. Como control se usó IgM purificada sin actividad de FR.

### **6.7 Comparación con artritis reumatoide**

Para evaluar la posible unión del FR al antígeno aviario, se incluyeron en esta fase del estudio a los sueros de los 25 pacientes con artritis reumatoide con FR positivo y al FR purificado. La prueba para AAA fue realizada siguiendo los mismos métodos de ELISA usados en NHAA.

### **6.8 Inmunoblot**

La reactividad contra IgM, IgG e IgA se estudió por inmunotransferencia. Para ello, la IgM, IgG e IgA puras (10 µg/pozo) fueron separadas en un gel de acrilamida al 10% bajo condiciones reductoras (26) y posteriormente se realizó una transferencia a nitrocelulosa (27). Estas membranas se bloquearon con ASB al 1% toda la noche y las muestras fueron incubadas por 3 horas a 37°C. A continuación se realizó el lavado con ASF-T y se incubaron con anticuerpos anti-IgM, anti-IgG y anti-IgA marcados con peroxidasa utilizando una concentración óptima. El revelado se realizó por quimioluminiscencia (ECL-detection system. Amersham USA) y los resultados fueron comparados con marcadores de peso molecular comerciales (Bio Rad Richmond, Ca. USA). Los sueros con FR positivo



obtenidos del grupo con artritis reumatoide y la IgM purificada con actividad de FR fueron incluidos como controles.

### **6.9 Estudio del antígeno**

En este estudio la participación del antígeno como causa de interferencia fue excluida razonablemente y por lo tanto no fue estudiada a profundidad. A pesar de ello, se realizaron algunos análisis al respecto. El antígeno estéril fue estudiado aplicando una alícuota del pool de antígeno al medio de cultivo específico para *Staphylococcus aureus*, resultando negativa la prueba. También se realizaron una incubación con amortiguador de citratos (12) y una absorción con *N*-acetil-D-glucosamina (19) para excluir la interferencia por ácido teicoico.

### **7. Análisis estadístico**

Se realizó una comparación de los resultados obtenidos por ELISA respecto a los AAA, así como los cambios que ocurrieron después del método de cromatografía, y de los niveles de anticuerpos con actividad contra diferentes inmunoglobulina, incluyendo la IgM con actividad de FR en los diferentes grupos de estudio. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de U de Mann Whitney (Statistica V 4.2).

## 8. Resultados

### 8.1 Anticuerpos contra antígeno aviario

Los hallazgos serológicos respecto a los AAA revelaron que 28 de los 59 pacientes con NHAA (47.4%) mostraron la presencia simultánea de anticuerpos IgM, IgG e IgA contra antígeno aviario. Estos valores de AAA excedieron los niveles de referencia (media + 2 DS) de los donadores sanos sin historia de exposición a aves (IgM  $P = 1 \times 10^{-15}$ ; IgG  $P = 8 \times 10^{-9}$  e IgA  $P = 5 \times 10^{-15}$ ). La comparación con el grupo de contactos asintomáticos reveló que estos niveles de anticuerpos también fueron superiores en NHAA (IgM  $P = 6 \times 10^{-10}$ ; IgG  $P = 1 \times 10^{-4}$  e IgA  $P = 3 \times 10^{-9}$ ). Fue notable, que sólo 4 de 47 muestras en el grupo asintomático presentaron pruebas positivas simultáneas para AAA de las clases IgM, IgG e IgA en títulos altos, lo cual contrastó con la alta frecuencia de estos cambios en la NH ( $P = 1 \times 10^{-4}$ ) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Hallazgos clínicos y serológicos en NH con anticuerpos IgM, IgG e IgA contra antígeno aviario.

Paciente	Edad (años /sexo)	Clasificación enfermedad	Evolución (meses ó años)	Prueba de Ouchterlony		AAA IgM		AAA IgG		AAA IgA		FR IgM ODU
				FR positivo	FR negativo	AAA IgM ODU	AAA IgG ODU	AAA IgA	AAA IgA			
001	35/M	Agudo	6 m	Pos, 2		0.232	0.864	0.501		0.360		
002	40/F	Agudo	7 m	Pos, 1		0.480	1.158	1.645		0.485		
003	57/F	Agudo	7 m	Pos, 1		0.149	0.873	0.743		0.354		
004	45/F	Subagudo	1 a	Pos, 1		0.230	0.668	0.247		0.704		
005	49/F	Subagudo	1 a	Pos, 1		0.243	0.486	0.436		0.690		
006	39/F	Subagudo	1.4 a	Pos, 1		0.402	0.278	0.606		0.570		
007	67/F	Crónico	10 a	Pos, 2		0.173	0.712	0.452		0.410		
008	51/F	Crónico	2 a	Pos, 1		0.386	1.216	1.188		0.362		
009	74/F	Crónico	5 a	Pos, 1		0.210	0.964	1.177		0.612		
010	26/M	Crónico	3 a	Pos, 1		0.210	0.751	0.149		0.327		
011	42/F	Crónico	3.5 a	Pos, 1		0.203	0.627	0.381		0.599		
012	58/F	Agudo	5 m	Neg		0.494	0.381	1.390		0.848		
013	30/F	Agudo	8 m	Neg		0.368	0.512	0.613		0.971		
014	51/F	Agudo	6 m	Neg		0.366	0.375	0.929		0.654		
015	40/F	Subagudo	1.9 a	Neg		0.506	0.672	0.901		0.465		
016	35/F	Crónico	8 a	Neg		0.364	0.686	0.357		0.508		
017	56/F	Crónico	6 a	Neg		0.355	0.681	0.432		0.599		
018	46/M	Crónico	13 a	Neg		0.180	0.246	0.252		0.261		
FR negativo												
019	35/M	Agudo	3 m	Pos, 2		0.198	0.595	0.107		0.171		
020	33/F	Agudo	3 m	Pos, 1		0.805	1.097	0.409		0.164		
021	29/F	Subagudo	1 y	Pos, 2		0.229	1.165	0.314		0.155		
022	43/M	Crónico	5 y	Pos, 2		0.142	1.274	1.860		0.156		
023	52/F	Crónico	4 y	Pos, 1		0.335	0.642	0.819		0.157		
024	52/F	Agudo	4 m	Neg		0.291	0.607	0.232		0.237		
025	67/F	Subagudo	1 y	Neg		0.380	0.304	0.170		0.219		
026	39/M	Subagudo	1.6 y	Neg		0.191	0.423	0.187		0.240		
027	50/F	Crónico	11 y	Neg		0.179	0.290	0.315		0.173		
028	48/F	Crónico	4 y	Neg		0.161	0.281	0.606		0.196		

FR= factor reumatoide; UDO= unidades de densidad; óptica; Pos= positivo; Neg= negativo; 1, 2= bandas de precipitación. Valores de referencia de AAA y FR en controles sanos sin exposición a aves (media +2 DE IgM 0.134, IgG 0.237, e IgA 0.107 UDO ) (media +2 DE FR 0.316 UDO ) y contactos asintomáticos (media +2 DE IgM 0.271, IgG 1.133, e IgA 0.502 UDO ) (media +2 DE FR 0.251 UDO).

Las pruebas que determinaron la especificidad por ELISA mostraron una disminución en los AAA por abajo del 95% después de la incubación del suero con un acumulo de antígeno aviario en comparación a las muestras no tratadas. No se encontraron cambios al usar sueros exentos de gamaglobulinas y al comparar estos resultados con las muestras no tratadas.

### 8.2 Evaluación de la interferencia

Al evaluar los niveles basales de AAA de los pacientes con NHAA y sus cambios después de las condiciones experimentales estudiadas se encontraron resultados interesantes. La detección de la reactividad contra antígeno aviario por ELISA usando las fracciones depletadas de IgG en 18 de las 28 muestras que presentaron AAA de las clases IgG, IgM e IgA simultáneamente en títulos altos demostró una importante reducción en los niveles de IgM y en menor proporción para IgA con un rango de 34 hasta 84% ( $P = 4 \times 10^{-5}$ ) (figura 1).

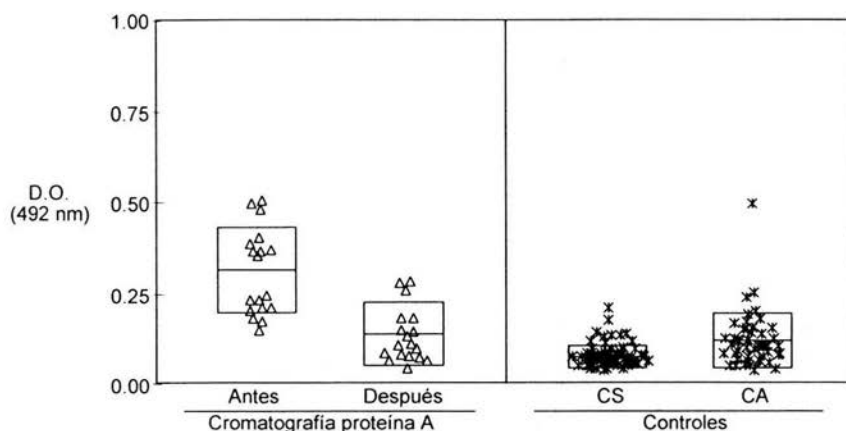


Figura 1. Panel izquierdo, comparación de los valores de anticuerpos contra antígeno aviario (AAA) de la clase IgM por ELISA en neumonitis por hipersensibilidad (NHAA) antes y después de la cromatografía de afinidad. Panel derecho niveles de AAA de la clase IgM en controles sanos (CS) y contactos asintomáticos (CA).

Las muestras obtenidas a través de la columna Sepharosa CL-4B sin proteína A, no presentaron cambios estadísticamente significativos en los niveles de AAA de clase IgM. La reducción fue más intensa en los sueros con niveles altos de AAA IgG. Diez de los sueros de este grupo de 28 pacientes con AAA elevados no mostraron cambios sustanciales en los AAA de la clase IgM ( $P= 0.969$ ) al separar la IgG por cromatografía.

Al reconstituir con la fracción IgG las muestras procesadas a través de la columna de sepharosa con proteína A se reprodujo el efecto de interferencia de AAA de clase IgM. La IgG eluída de suero normal o el uso de una fuente comercial de IgG purificada (Sigma, Co. USA) no generó ningún cambio en los resultados de los AAA IgM.

Estos resultados se interpretaron como la presencia de un efecto de interferencia que producía resultados falsos positivos de AAA de la clase IgM en los pacientes con NHAA.

La evaluación de AAA de clase IgA en NHAA, reveló que estos niveles difirieron en menor proporción que la IgM después de la depleción de IgG. Se encontró una mínima reducción de los valores de AAA de la clase IgA después de la eliminación de IgG en aquellos sueros que mostraron valores altos (rangos de 2 hasta 20 %). La cromatografía control con sepharosa CL-4B mostró un cambio similar en los niveles de IgA. También se obtuvo un ligero aumento de los niveles de IgA después de incrementar la concentración de IgG pura con actividad de AAA, sin embargo ocurrió un efecto similar con la IgG normal.

### 8.3 Resultados de los Anticuerpos IgG con actividad anti-IgM y anti-IgA, anticuerpos IgA anti-IgG y anti-IgM y anticuepos IgM anti-IgG y anti-IgA.

Las muestras de los pacientes con NHAA y controles sanos mostraron valores similares en los inmunoensayos respectivos y no se apreciaron diferencias significativas, usando IgM, IgG o IgA purificadas. El estudio de IgG con actividad anti-IgM e IgA reveló los siguientes resultados ( $0.211 \pm 0.016$  en NH vs  $0.207 \pm .023$  en CS y  $0.123 \pm 0.013$  en NH vs  $0.116 \pm 0.012$  en CS;  $P = 0.09$  y  $= 0.07$  en los ensayos correspondientes). Por su parte la determinación de IgA contra IgM e IgG mostró las siguientes lecturas ( $0.164 \pm 0.022$  en NH vs  $0.164 \pm .012$  en CS y  $0.112 \pm 0.016$  en NH vs  $0.108 \pm 0.012$  en CS);  $P = 0.15$  y  $P = 0.40$  en las pruebas respectivas (figuras 2 y 3)

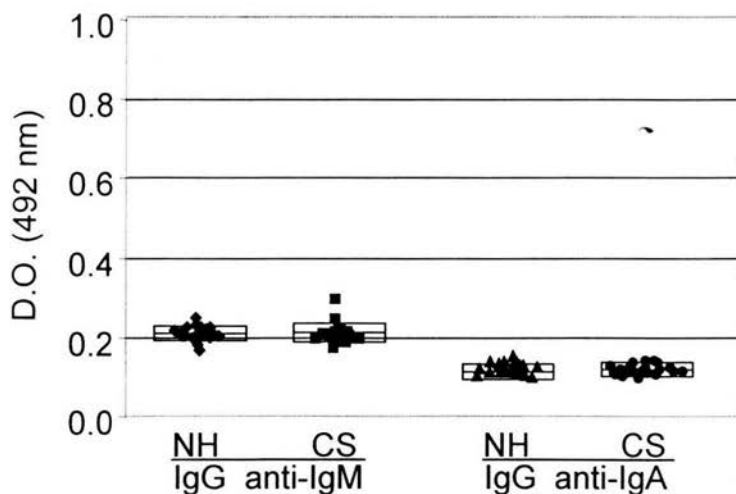


Figura 2. Resultados por ELISA al estudiar la actividad de anticuerpos IgG contra IgM e IgA. NH: neumonitis por hipersensibilidad; CS: controles sanos. Las líneas horizontales representan la media  $\pm$  D.E. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones estudiadas.

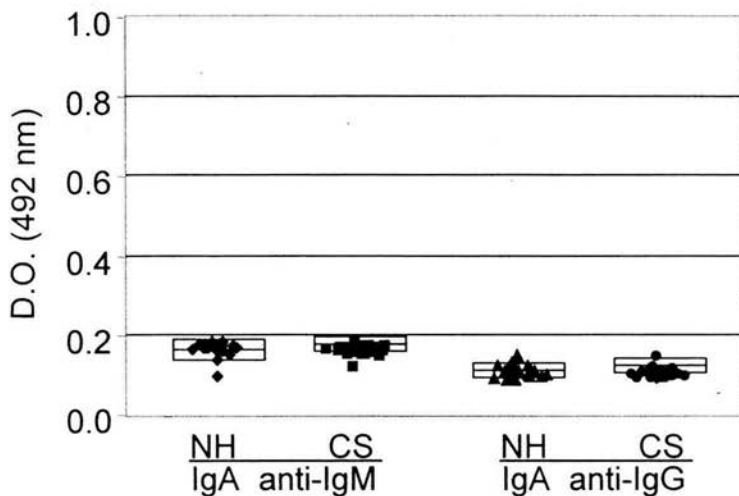


Figura 3. Resultados por ELISA al estudiar la unión de IgA con IgM e IgG. NH: neumonitis por hipersensibilidad; CS: controles sanos. Las líneas horizontales representan la media  $\pm$  D.E. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones estudiadas.

#### 8.4 Resultados de la IgM con actividad de factor reumatoide

En vista de que el efecto falso positivo en la reactividad de IgM AAA sugirió la unión endógena de una IgM con IgG, el estudio de la IgM con actividad de FR fue esencial. La comparación de los valores de este anticuerpo entre el NHAA y los controles sanos reveló diferencias estadísticamente significativas ( $P = 8 \times 10^{-6}$ ). En el grupo seleccionado con NHAA se detectó una alta frecuencia de sueros con actividad de FR que excedieron la media + 2DS de los controles sanos (60.7 %) y los valores de referencia de los contactos asintomáticos (64.2 %). Los niveles de este tipo de IgM en NHAA ( $0.416 \pm 0.230$ ) difirieron estadísticamente de los controles sanos y de los contactos sin enfermedad ( $0.168 \pm 0.074$  y  $0.123 \pm 0.064$  respectivamente ( $P = 8 \times 10^{-10}$  y  $6 \times 10^{-10}$ )).

El anticuerpo IgM con actividad anti-IgG humana se presentó con altos títulos en aquellos pacientes que mostraron en mayor grado resultados falsos positivos de AAA de la clase IgM, mientras que las pruebas fueron negativas o con bajos niveles de actividad de FR en las muestras sin interferencia o con un menor efecto falso positivo.

Un hallazgo interesante fue la presencia de niveles similares de IgM con actividad de FR en algunos pacientes con NHAA respecto a la artritis reumatoide (figura 4).

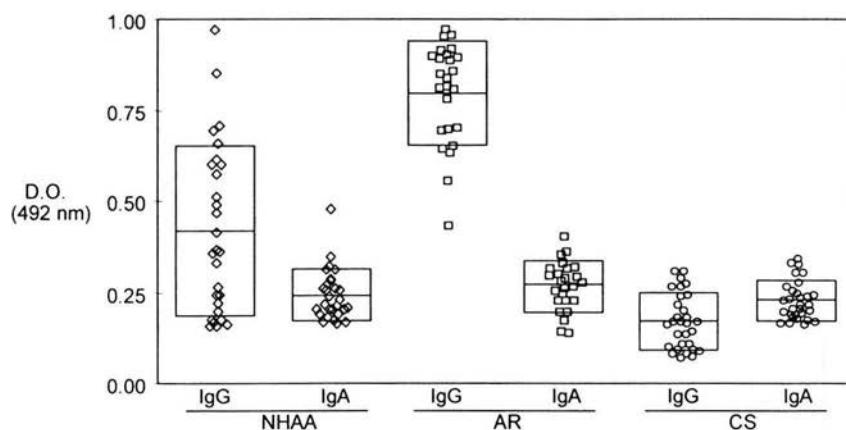


Figura 4. Resultados de los niveles de anticuerpos contra IgG (actividad de FR) e IgA mediante ELISA en la neumonitis por hipersensibilidad (NHAA), artritis reumatoide (AR) y controles sanos (CS). Las líneas horizontales representan la media  $\pm$  DE en unidades de densidad óptica (DO) en cada grupo.

El grupo de pacientes con artritis se incluyó como otro control en este estudio y desde luego, la comparación estadística con los controles sanos y contactos asintomáticos reveló diferencias significativas  $P=(2 \times 10^{-10}$  y  $3 \times 10^{-12})$  mientras que los controles sanos y contactos asintomáticos tuvieron valores similares ( $P = 0.29$ ). La actividad de FR fue



detectada también en las fracciones depletadas de IgG de las muestras con NHAA que mostraron pruebas falsas positivas.

La prueba modificada que permitió detectar la actividad de FR IgM contra IgA no reveló resultados positivos en las muestras con NHAA. Los valores de este tipo de anticuerpos fueron similares en NHAA y sujetos sanos y contactos asintomáticos ( $P = 0.607$  y  $0.121$ ). La comparación entre los pacientes con NHAA y artritis reumatoide no mostró valores estadísticamente significativos ( $P = 0.066$ ). También fue de interés que el grupo de contactos asintomáticos, incluyendo los cuatro pacientes con AAA positivos para las clases IgM, IgG e IgA en títulos altos no presentaron pruebas positivas de IgM con actividad de FR.

Para confirmar la posibilidad de que la IgM con función de FR fuera responsable de los resultados falsos positivos, se estudió el efecto experimental de estas inmunoglobulinas purificadas. La adición de una concentración creciente de IgM purificada que contenía actividad de FR a los sueros con AAA de clase IgG generó una elevación de los niveles de AAA de clase IgM que excedieron el valor original (figura 5). El mismo efecto fue encontrado en las fracciones IgG de los sueros con NHAA. Estos cambios fueron más prominentes en muestras con niveles altos de AAA de clase IgG. No hubo cambios significativos en los niveles de AAA de clases IgG e IgA y el control sin actividad de FR no generó efectos de interferencia.

### **8.5 Pruebas de reacción cruzada e interacción con otras inmunoglobulinas**

Los sueros con FR positivo en el grupo con artritis presentaron resultados negativos en las pruebas de AAA de las clases IgM, IgG, o IgA. Los valores de AAA en artritis reumatoide

fueron similares a los detectados en los sujetos sanos (IgM  $P = 0.08$ ; IgG  $P = 0.223$  e IgA  $P = 0.07$ ).

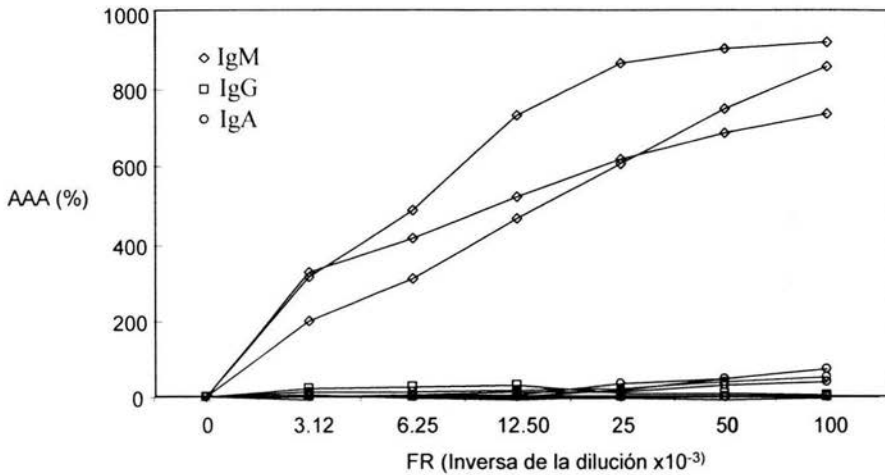


Figura 5. Resultados del efecto de interferencia en porcentaje (%) de anticuerpos contra antígeno aviario (AAA) de las clases IgM, IgG e IgA generado mediante la adición de una concentración creciente de IgM purificada con actividad de factor reumatoide (IgM) (inversa de la dilución, 1/dilución). Se incluyen 3 muestras representativas con elevación basal de los valores de AAA de la clase IgG.

### 8.6 Estudio del antígeno y otras condiciones de interferencias

Aunque la participación del antígeno como causa del efecto de interferencia no fue estudiada de manera profunda, los análisis que realizamos al respecto mostraron que el cultivo para *Staphylococcus aureus*. fue negativo. Además, no hubo cambios en los resultados de ELISA cuando se usó un amortiguador de citratos de acuerdo a trabajos previos (12) y al eliminar el ácido teicoico mediante la absorción con *N*-acetil-D-glucosamina (19). La posibilidad de que una actividad de fijación del complemento

participara en la interferencia fue excluida en los sueros de los pacientes por inactivación específica (56°C, 20 min.).

### 8.7 Resultados de Inmunoblot

La presencia de la actividad de FR de la clase IgM en los sueros con NHAA fue confirmada por inmunoblot usando IgG e IgA purificadas como antígenos y fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpo contra IgM humana marcada con peroxidasa (Sigma Co., USA) (3). Los resultados mostraron reactividad contra las cadenas pesadas de la IgG purificada (53.0 kDa) en los sueros con títulos altos de IgM con actividad de FR que fueron comparables a los resultados detectados en sueros con FR positivo del grupo con artritis reumatoide (Figura 6).

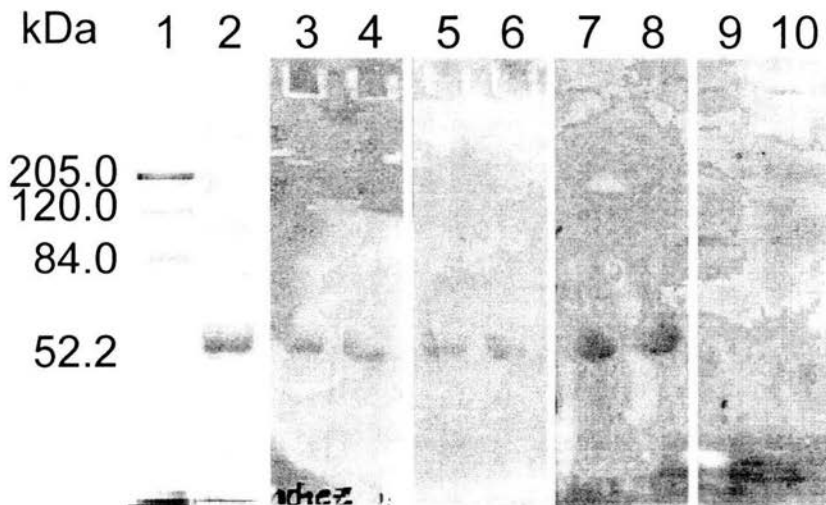


Figura 6. Los carriles 1 y 2 muestran los marcadores de peso molecular y la separación de IgG humana purificada. La reactividad de IgM con actividad de factor reumatoide por inmunoblot fue detectada en la neumonitis por hipersensibilidad (carriles 3 y 4). Este resultado fue similar en las muestras de artritis reumatoide (carriles 5 y 6). La IgM purificada con actividad de factor reumatoide (carriles 7 y 8) y un control con resultados negativos se incluyen en la figura (carriles 9 y 10).

## **9. Aspectos clínicos**

El efecto de interferencia se encontró tanto en pacientes con una historia reciente de exposición a antígeno aviario y enfermedad aguda (25), como en pacientes con enfermedad pulmonar subaguda o un padecimiento crónico. En el grupo con NHAA con pruebas positivas de IgM con actividad de FR se excluyó la presencia de artritis reumatoide o de otras enfermedades del tejido conectivo en las que puede estar presente el FR. Los hallazgos clínicos, radiográficos y las anomalías serológicas, así como el hábito de tabaquismo no revelaron ninguna relación significativa con el efecto de interferencia que detectamos en las pruebas de AAA.

## **10. Discusión**

A pesar de que los hallazgos serológicos no son definitivos en el diagnóstico de NHAA, la detección de clases específicas de AAA y su cuantificación ha sido de gran valor para el estudio de la enfermedad.

Aunque es difícil encontrar un acuerdo general, un buen número de reportes ha señalado que la detección sérica de niveles altos de AAA de las clases IgM, IgG y/o IgA mediante pruebas de fijación de complemento, hemaglutinación, RIA y particularmente por ELISA

(3-7, 29,30) puede ser de utilidad al tratar de distinguir a esta patología de los contactos sanos y controles sin exposición al antígeno y en ocasiones de otras enfermedades intersticiales pulmonares (3-7)

Además del valor de los AAA en el diagnóstico diferencial, estas pruebas pueden ser útiles al relacionarlas con algunas características clínicas. El hallazgo de pruebas positivas para IgE puede ocurrir en pacientes con NHAA (7,31-34) con antecedentes atópicos y la presencia de IgM en títulos altos ha sido reportada durante la enfermedad aguda en estudios recientes (3,7,33). Al realizar algunos estudios longitudinales, distintos autores han encontrado la persistencia de IgG e IgA durante la evolución de la enfermedad, mientras que otras evidencias documentan una disminución de estas inmunoglobulinas después de varios años de seguimiento (5,10,29). Además, se ha descrito que los niveles de IgM e IgG pueden fluctuar después de suspender la exposición al antígeno ó debido al tratamiento con corticoesteroides (7,8).

Por lo anterior, la cuantificación de los AAA tiene un valor importante para el estudio de la NHAA, por lo que es preciso conocer las condiciones que pueden causar una interferencia y así evitar errores en la interpretación de los resultados, cuando se aplican al estudio clínico. En particular es necesario distinguir a los pacientes que presentan AAA en títulos altos o resultados claramente negativos, así como identificar los factores que pueden generar pruebas falsas positivas o falsas negativas.

Estudios previos han mostrado que hay un gran número de factores que pueden afectar la detección de AAA al realizar diferentes inmunoensayos. Aunque en los primeros estudios fueron reportadas pruebas falsas positivas de AAA mediante Ochterlony (12,17,19,35), también se ha constatado la presencia de resultados falsos negativos en inmunoensayos de

fase sólida (12,15,16,29). En años recientes, el estudio de NHAA ha hecho evidente que al aplicar diferentes métodos de apoyo al diagnóstico, como las pruebas de fijación de complemento, hemaglutinación (20,21) y ELISA, se puede encontrar resultados falsos positivos o falsos negativos, y que estos efectos pueden depender de diferentes mecanismos de interferencia.

En este trabajo se presentan evidencias que confirman la presencia de un efecto de interferencia endógena al detectar AAA por ELISA en pacientes con NHAA. Es de interés señalar, que estas observaciones derivaron de nuestro interés en estudiar si la detección de estos marcadores era adecuada usando muestras de pacientes que simultáneamente presentaban AAA de las clases IgM, IgG e IgA en títulos altos.

Aunque nuestra hipótesis inicial fue que podríamos detectar cambios importantes en los niveles de las diferentes clases de AAA debido a un efecto competitivo durante el reconocimiento del antígeno, encontramos un alto porcentaje de muestras con IgM endógena con actividad de FR que generó resultados falsos positivos.

Los hallazgos en este reporte no son del todo sorprendentes. Las pruebas de FR positivo han sido descritas en diferentes tipos de neumonitis por hipersensibilidad incluyendo a pacientes con bagazosis y en la neumonitis debida a actinomicetos termófilos (12,35,36). En la NHAA el hallazgo de FR ha sido descrito en un número limitado de trabajos, algunos anecdóticos ó en series pequeñas de pacientes, además, en algunos trabajos se ha encontrado que este marcador puede estar presente en títulos elevados (2,28).

La presencia de IgM con actividad de FR puede explicar algunas anomalías serológicas que han sido reportadas como fenómenos poco comunes en la NH. La presencia de IgM con actividad de FR puede causar resultados falsos positivos cuando se evalúan AAA de la

clase IgM en pacientes con una exposición crónica (31). El reporte de una menor interferencia en la detección de AAA de la clase IgM después de la disminución de anticuerpos IgG e IgA (7) puede deberse a un efecto endógeno de la IgM con actividad de FR. La descripción de AAA junto con otro tipo de anticuerpos (6) puede ser la consecuencia de un resultado falso positivo producido por el FR. Desafortunadamente, no se han realizado análisis específicos respecto a dichas posibilidades. De hecho, al revisar la literatura, no hay reportes previos que enfatizan que el efecto de interferencia de FR puede producir resultados falsos positivos al detectar AAA, lo que nos parece relevante en el contexto clínico debido a que entre las repercusiones que puede generar, se encuentra la posibilidad de realizar intervenciones quirúrgicas ó terapéuticas innecesarias (10).

Aunque hay pocos estudios que han evaluado los mecanismos que pueden explicar un fenómeno de interferencia al detectar AAA han surgidos propuestas concretas en algunos tipos de inmunoensayos. Una variación en el origen del antígeno puede producir resultados falsos positivos o negativos de AAA en sueros que tienen diferente especificidad inmunológica (29). Se han encontrado niveles bajos de AAA o pruebas falsas negativas por RIA o ELISA (14,37,38) en pacientes con antecedentes de tabaquismo debido a una disminución en la producción de anticuerpos en estos individuos. También se reportan resultados falsos positivos de AAA mediante pruebas de precipitación debido a la presencia elevada de proteína C-reactiva en el suero de algunos pacientes (12). En ocasiones, los resultados falsos positivos por Ouchterlony se pueden explicar por la presencia de ácido teicoico, que ha sido detectado como un contaminante común en los residuos orgánicos que se utilizan como antígenos (19). La reacción cruzada de anticuerpos contra componentes aviarios y algunos antígenos de eritrocitos ha generado pruebas de precipitación falsas

positivas de acuerdo a algunos autores (20). La presencia de resultados falsos positivos en pruebas de inmunodifusión doble y ELISA puede ocurrir debido a una reactividad cruzada cuando hay antecedente de exposición a productos de otras aves distintas a la paloma (21).

La presencia de IgM con actividad de FR ha sido clasificada como una fuente endógena de interferencia en diferentes inmunoensayos (13). En reportes previos, el FR ha sido una causa de resultados falsos positivos en pruebas de aglutinación, nefelometría y ELISA (36,37) y dentro de los mecanismos que se han propuestos para explicar estos efectos destaca la interacción de este anticuerpo con la porción Fc de la IgG de captura o de detección, o bien con la IgG contenida en la propia muestra que se estudia. La magnitud de los resultados falsos positivos o falsos negativos, depende principalmente de la capacidad de unión de la IgM a estas inmunoglobulinas, pero nosotros encontramos que los niveles altos de IgG con capacidad de AAA, provocaron un fenómeno de interferencia importante. Al analizar el formato inmunoenzimático que se utilizó en este estudio podemos proponer un nuevo mecanismo de interacción que produce resultados falsos positivos.

Por lo anterior, el presente estudio cumple con los criterios para sustentar que una unión endógena de la IgM con IgG fue la causa directa de los hallazgos falsos positivos durante la detección de AAA por ELISA. Otras causas de interferencia fueron excluidas razonablemente. Con las estrategias empleadas eliminamos la posible interacción con el anticuerpo de detección al usar fragmentos F (ab')<sub>2</sub> anti IgM marcados con peroxidasa y también excluimos la intervención de una reacción cruzada de la IgM con actividad de FR con el antígeno aviario. Por otro lado, aunque el FR podría producir un efecto de interferencia por otros mecanismos endógenos (11,35), excluimos razonablemente la alternativa de que una actividad de fijación de complemento, la agregación de anticuerpos



inespecíficos, o el efecto de prozona pudieran explicar los resultados falsos positivos. Aunque la posibilidad de una actividad anti-idiotipo en los sueros con NHAA fue razonablemente descartada, este mecanismo específico esta siendo estudiado actualmente en el laboratorio donde se desarrollo este tema.

Finalmente, los propios AAA tienen la posibilidad de participar como factores endógenos de interferencia en diferentes inmunoensayos. A este respecto se ha reportado que los sueros de pacientes con NHAA pueden tener una actividad de fijación de complemento contra antígenos de *Clamydia* y virus de Influenza A y B debido a que estos microorganismos se cultivan en embriones o tejidos de aves (41). También se ha descrito que en algunos sueros se pueden encontrar tanto AAA como anticuerpos contra *Aspergillus fumigatus*, *Tricosporon cutaneum* y actinomicetos termofilicos (11,35,42), lo que sugiere la posibilidad de resultados falsos positivos. Por lo anterior, actualmente estudiamos si los AAA son una causa potencial de interferencia en la detección de otros marcadores serológicos en pacientes con NH, particularmente en aquellos que presentan algún tipo de enfermedad crónica.

## **11. Conclusiones**

Se logró identificar la presencia de anticuerpos endógenos de la clase IgM que tuvieron la capacidad de interferir en la detección de AAA en un sistema de ELISA.

La frecuencia de pacientes con NH en los que se encontró IgM con actividad de FR fue superior al 60%, al menos en nuestro grupo de estudio.

Aunque el mecanismo de interferencia en el inmunoensayo dependió de la unión de IgM con IgG, los niveles altos de AAA de la clase IgG incrementaron la posibilidad de encontrar resultados erróneos.

Se confirmó que en este tipo de interferencia no participaron otras condiciones relacionadas con el inmunoensayo, incluyendo las características del antígeno, un efecto prozona, la agregación inespecífica de inmunoglobulinas, así como la actividad de fijación de complemento, ó una reacción cruzada.

Consideramos que nuestro estudio es importante en la practica clínica, debido a que puede evitar una interpretación incorrecta de las pruebas de apoyo al diagnóstico y minimizar la posibilidad de intervenciones médicas innecesarias en los pacientes con NHAA.

## **12. Bibilografía**

1. Shuyler M. 1998. Hypersensitivity pneumonitis. Pulmonary diseases and disorders. Chap 71., Fishman AP (Ed) Mc Graw Hill, 3th Ed. Pp 1085-1097.
2. Selman M, Terán L, Mendoza A, Camarena A, Martínez-Cordero E, Lezama M, Rubio HM. 1987. Increase of HLA DR7 in pigeon breeder's lung in a Mexican population. Clin Immunol Immunopathol 44:63-70.
3. Martínez-Cordero E, Aguilar León DE, Novelo RV. 2000. IgM antiavian antibodies in sera from patients with pigeon breeder's disease J Clin Lab Anal 14: 201-207.
4. Patterson R, Wang JLF, Fink JN, Calvanico NJ, Roberts M. 1979. IgA and IgG antibody activities of serum and bronchoalveolar fluid from symptomatic and asymptomatic pigeon breeders. Amer Rev Res Dis 120:1113-1118.

5. Yoshizawa Y, Mirake S, Sumi Y, Hisauchi K, Sato T, Kurup VP. 1995. A follow-up study of pulmonary function tests, bronchoalveolar lavage cells and humoral and cellular immunity in bird fancier's lung. *J Allergy Clin Immunol* 96:122-129.
6. Yoshizawa Y, Ohtani Y, Inoue T, Miyake S, Ikeda A, Tanba M, Kurup VP. 1995. Immune response to inhaled antigens local antibody production in the respiratory tract in healthy and lung disease. *Clin Exp Immunol* 100:395-400.
7. Patterson R, Schatz M, Fink JN, De Swarte RS, Roberts M, Cugell D. 1976. Pigeon breeder's disease. I. Serum concentrations; IgG, IgM, IgA, IgE antibodies against pigeon serum. *Am J Med* 60:144-155.
8. Kitt S, Woo CL, Fink JN, Calvanico NJ. 1986. Immunoglobulin G4 in pigeon breeder's disease. *J Lab Clin Med* 108:442-447.
9. Bourke SJ, Banham SW, Carter R, Lynch P, Boyd G. 1989. Longitudinal course of extrinsic allergic alveolitis in pigeon breeders. *Thorax* 44:418-428.
10. Kricka LJ. Interferences in immunoassay. Still a threat. 2000. *Clin Chem*. 46: 1037-1038.
11. Andersen P, Christensen KM, Jensen BE, Axèl K, Laursen JCS, Geday H, Lundsgaard A, Andersen HK. 1982. Antibodies to pigeon antigens in pigeon breeders. Detection of antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Respir Dis* 63:113-121.
12. Chmelik F, Flaherty DK, Reed CE. 1975. Precipitating antibodies in office workers and hospitalized patients directed toward antigens causing hypersensitivity pneumonitis. *Am Rev Resp Dis* 111: 201-205.
13. Miller JJ, Levinson SS. 1996. Interferences in immunoassays. *Immunoassay*.

Diamandis EP, Christopoulos TK (eds) Academic Press., pp. 165-190.

14. Mc Sharry C, Banham SW, Boyd G. 1985. Effect of cigarette smoking on the antibody response to inhaled antigens and the prevalence of extrinsic allergic alveolitis among pigeon breeders. *Clin Allergy* 15:487-494.

15. Huizinga M, Lubbers M, Berrens L. 1984. Detection of precipitating and complement consuming antibodies by enzyme linked immunosorbent assay in pigeon breeder's disease. *Immunobiology* 166:168-176.

16. Engvall E, Perlmann P. 1972. Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA. III Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109:129-135.

17. Martínez-Cordero E, Bessudo Babani A, Treviño-Pérez SC, Terán L, Selman M, Martínez-Miranda E. 1989. Circulating autoantibodies in patients with pigeon breeder's disease. *Allergol Immunopathol* 17:1-6.

18. Fink JN. 1986. Disease of the lung. In *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, NR Rose, H Friedman, JL Fahey, Eds. American Society of Microbiology, Washington, DC, Chap 105, p 698-701.

19. Faux JA, Holford-Strevens V, Wells ID, Pepys J. 1970. False positive precipitation reactions to extracts of organic dusts due to a teichoic acid from *S. aureus*. *Clin Exp Immunol* 7:897-902.

20. Shanfield MD, 1976. P1 blood group, pigeon antigens, and respiratory diseases. *Chest* 70:694.

21. Berrens L, Verschuren M, Van Dijk AG, Guikers CL. 1986. Antibodies against hen's

- egg proteins in pigeon breeder's disease. *Clin Allergy* 16:355-363.
22. Diamandis E, Cristopoulos T. 1996. (Ed.) Academia Pres (San Diedo, N.Y., Bostón, London) Cap 7 Interferences in immunoassays. Pp 156-190.
23. Larson A., Sjoquis J. 1987. Chiquen antibodies a toll to avoid false positive results by reumatoide factor in latex fixation test.
24. Henry J. 1993 (Ed) Salvat 9<sup>th</sup> Ed Cap 34 Inmunoanálisis en el laboratorio pp 873-906.
25. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315-324.
26. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
27. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheet: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.
28. Martínez-Cordero E, Negrete-García MC, Mendoza A. 1992. Rheumatoid factor activity in serum and bronchoalveolar lavage from patients with acute hypersensitivity pneumonitis. *J Invest Allergol Clin Immunol* 2:254-257.
29. McSharry C, Banham SW, Lynch PP, Boyd G. 1984. Antibody measurement in extrinsic allergic alveolitis. *Eur J Respir Dis* 65: 259-265.
30. Calvanico NJ, Ambegaonkar SP, Schlueter DP, Fink JN. 1980. Immunoglobulin levels in bronchoalveolar lavage fluid from pigeon breeders. *J Lab Clin Med* 96:129-140.

31. Pinon JM, Geers R, Lapan H, Pailler S. 1987. Immunodetection by enzyme linked immunofiltration assay (ELIFA) of IgG, IgM, IgA and IgE antibodies in bird breeder's disease. *Eur J Respir Dis* 71:164-169.
32. Faux JA, Wide L, Hargreave FE, Longbottom JL, Pepys J. 1971. Immunological aspects of respiratory allergy in budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) fanciers. *Clin Allergy* 1:149-158.
33. Wilkie BN, Nielsen KH, Little J. 1978. Experimental hypersensitivity pneumonitis: Serum immunoglobulins G1, G2, M A and E in *Micropolyspora faeni* sensitized and desensitized calves. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 56:79-86.
34. van Toorenenbergen AW, Gerth van Wijk R, van Dooremalen G, Dieges PH. 1985. Immunoglobulin E antibodies against budgerigar and canary feathers. *Int. Archs Allergy Appl Immun* 77:433-437.
35. Banaszak EF, Thiede WH, Fink JN. 1970. Hypersensitivity pneumonitis due to contamination of an air conditioner. *New Eng J Med* 283:271-26.
36. Flaherty DK, Braun SR, Marx JJ, Blank JL, Emanuel DA, Rankin J. 1980. Serologically detectable HLA-A-B- and C loci antigens in farmer's lung disease *Amer Rev Resp Dis* 122: 437-443.
37. McSharry C, Banham SW, Lynch PP, Boyd G. 1984. Antibody measurement in extrinsic allergic alveolitis. *Eur J Respir Dis* 65:259- 265.
38. Carrillo T, Rodriguez de Castro F, Cuevas M, Diaz F, Cabrera P. 1991. Effect of cigarette smoking on the humoral immune response in pigeon fancier. *Allergy* 46:241-244.
39. Müller W, Mierau R, Wohltmann D. 1985. Interference of IgM rheumatoid factor with

nephelometric C-reactive protein determinations. *J Immunol Methods* 80:77-90

40. Larsson A, Sjöquist J. 1988. Chicken antibodies: a tool to avoid false positive results by rheumatoid factor in latex fixation tests. *J Immunol Methods* 108:205-208

41. Newman Taylor AJ, Taylor P, Bryant DH, Longbottom JL, Pepys J. 1977. False positive complement fixation tests with respiratory virus preparation in bird fanciers with allergic alveolitis. *Thorax* 32:563-566.

42. Soda K, Ando M, Shimazu K, Sakata T, Yoshida K, Araki S. 1986. Different classes of antibody activities to *Trichosporon cutaneum* antigen in summer-type hypersensitivity pneumonitis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am Rev Resp Dis* 133:83-87.

### 13. Anexos

#### DETERMINACION DE AAA

Se realizó por medio de Ouchterlony.

Se utilizaron cajas de petri con agarosa al 1% en solución amortiguadora salina de fosfatos (PBS) 0.01M pH 7.4.

Se realizó una perforación central y seis periféricas de 4 mm de diámetro cada una.

En el pozo central se adicionó el antígeno aviario concentrado obtenido de un pool de suero de paloma y en los pozos periféricos se colocaron diluciones sucesivas (1:64- 1:1240) del suero a estudiar.

Se colocaron las placas en una superficie firme y plana en cámara húmeda por 48 Hrs. a temperatura ambiente.

Se determinó la presencia de AAA por la presencia de las bandas de precipitación.

#### ESTUDIO CUANTITATIVO DE LOS AAA

Se utilizó el método de ELISA.

Las condiciones óptimas utilizadas fueron estandarizadas previamente en el laboratorio.

Se utilizaron placas de microELISA (NUNC,Maxisorb).

Se colocaron 100 µl de antígeno aviario estéril con una dilución 1:4000 (10-12 µg/ml) en buffer de carbonatos 0.05M ph=9.6.

Se incubó 12 Hrs.a 37<sup>0</sup>C.

Se lavó cinco veces con solución buffer salina-fosfatos.(PBS Tween 20 0.05%).

Se bloqueó con albúmina sérica bovina (ASB) AL 1%

Se incubó a 4<sup>0</sup>C toda la noche.



Se lavó cinco veces con PBS Tween al 0.05%.

Se agregaron 100 µl por pozo de las muestras de los pacientes con una dilución 1:100, así como las muestras controles.

Se incubó 1Hr. a 37 °C.

Se lavó 5 veces con PBS Tween al 0.05%.

Se agregaron 100 µl por pozo de anticuerpos anti IgM, IgG e IgA fracciones F(ab')<sub>2</sub> marcadas con peroxidasa a diluciones óptimas (1:3000, 1:3500 y 1:1000) respectivamente.

Se utilizó como sustrato ortofenilendiamina (OFD) (Sigma Co. USA) el cual se preparó en amortiguador de citratos (0.1 M pH 5.0) y peróxido de hidrógeno.

Se incubó 15 min. a temperatura ambiente.

Se detuvo la reacción con 50 µl de ácido sulfúrico 2.5 N.

Se registró la lectura de absorbancia en un minilector de ELISA (Labsystem,Finland) a una longitud de onda de 492 nm

#### ESTUDIO DE LA POSIBLE INTERFERENCIA

Se realizan ELISA incluyendo un control positivo y suero normal (diluciones 1:100 y 1:200) para las tres inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA )

Se evaluó la presencia de valores elevados en las tres clases de inmunoglobulinas.

Se probó sensibilizando la placa en diferentes condiciones: Sin antígeno (solo con buffer de carbonatos) y con antígeno.

Se bloqueó con PBS Tween al 0.05% en albúmina bovina al 1% y sin albúmina.

Se bloqueó con leche y con albúmina

En todos los casos se observaron los mismos resultados.

Con los resultados anteriores se decidió separar una de las tres inmunoglobulinas del suero total.

Como primer paso, se eliminó IgG por medio de cromatografía de afinidad, utilizando una columna de sepharosa Cl-4B con proteína A (Sigma Co.USA).

Se colocó como control una columna de sepharosa Cl-4B sin proteína.

Se colocaron 500  $\mu$ l de muestra, dilución (1:10) en la columna.

Se incubaron las columnas por 3 hr.a 4°C.

Se recolectaron las muestras de ambas columnas.

Se lavaron las columnas con 500  $\mu$ l de PBS ( 0.01M pH=8.0)

Se agregaron 500  $\mu$ l de glicina-HCL (0.1M pH= 2.8) para eluir.

Se recuperó el eluido en una gota de TRIS ( 1.5 M pH=8) y se verificó que el pH de la muestra fuera de pH=7

Posteriormente se concentraron las muestras a su volumen original utilizando un equipo de ultrafiltración (Amicon) con una membrana YM1 de 25 mm.

Se adicionó la muestra eluida de la cromatografía en columna y se adicionó otro volumen igual de PBS (0.01M pH 7.2).

Se concentró tanto la muestra pasada por sepharosa 4B con proteína como la muestra pasada por sepharosa 4B sin proteína.

Posteriormente se realizó una ELISA tanto con las fracciones retenidas como por las eluidas para las tres inmunoglobulinas

## TÉCNICAS

Fundamentos.

### INMUNODIFUSION DOBLE (OUCHTERLONY)

Técnica basada en la precipitación al combinarse complejos de antígeno y anticuerpo en el punto de equivalencia, para formar redes insolubles.

Se utiliza un gel de agarosa como medio de soporte.

Se aplican el antígeno y el anticuerpo en pozos separados en el agar en el caso de una placa como soporte ó colocando el anticuerpo en la base de un tubo de ensayo y separándolo del antígeno mediante una capa de agar.

En el agar se lleva a cabo una difusión de los reactivos.

En un intervalo de tiempo de 18-48 h. se podrá observar el punto de equivalencia mediante una línea de precipitación.

## ELISA

(Análisis de inmunoabsorción enzimática)

En ésta técnica uno de los dos reactantes, el anticuerpo ó el antígeno, se fija a un soporte sólido antes de su interacción con el reactante complementario. Existen variantes de la técnica, dividiéndose en:

ELISA directo e indirecto:

El ELISA directo se utiliza normalmente para buscar antígenos conocidos y el ELISA indirecto para buscar y cuantificar anticuerpos, en ambos casos el antígeno se fija a una fase sólida.

Las concentraciones de las soluciones dependen de las condiciones del laboratorio, pero normalmente se utiliza una solución fosfatos-salina, para lavar. Los bloqueadores pueden ser: albúmina(bovina, humana ó de huevo), gelatina caseína y leche. Las enzimas de mayor uso son: peroxidasa de rabano y fosfatasa alcalinana.

ELISA no competitivo (tipo sándwich).

El anticuerpo inmovilizado en fase sólida se incuba con el antígeno.

Después de una fase de lavado el complejo antígeno-anticuerpo se incuba con un exceso de anticuerpo marcado enzimáticamente el cuál se fija a uno de los determinantes antigénicos.

Tras otra fase de lavado se agrega una solución de sustrato enzimático y se incuba.

El producto de la reacción enzimática es directamente proporcional a la concentración del antígeno.

## CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

### Fundamento

La cromatografía de afinidad es un método selectivo y reversivo en donde el antígeno se une a un material particulado e inerte (sefadex, sefarosa) y éste es empacado en una columna de cromatografía, por la cual se hacen pasar los anticuerpos contenidos en el suero, uniéndose al antígeno inmovilizado y formando complejos Ag-Ac.

Éstos complejos inmunes pueden ser fácilmente disociados por cambios en el ph, por adición de sales ó por calentamiento. La cromatografía de afinidad es una técnica muy empleada ya que ofrece un alto grado de purificación de proteínas en un solo paso.

## Electroforesis

### Fundamento

La separación analítica de las proteínas por su tamaño se hace habitualmente mediante la electroforesis a través de geles de poliacrilamida en presencia de SDS (dodecil sulfato), el cual se une a las proteínas en proporción al tamaño molecular y la carga negativa del detergente unido supera la carga intrínseca de la proteína.

El SDS produce un replegamiento de proteínas en varillas semirígidas de longitud proporcional al tamaño molecular, después de romper los enlaces disulfuro de las cadenas. Como resultado de ello, la resistencia hidrodinámica y la carga neta se hace en función completamente del tamaño.

El tamaño de una proteína desconocida puede determinarse comparando la distancia de migración en un gel de proteínas estándar de tamaño conocido. En general la porosidad del gel se hace lo suficientemente grande para evitar atrapamientos, aunque la resolución del tamaño puede aumentarse utilizando gradientes de concentración de poliacrilamida cruzada.

### Inmunoblot

La identificación de una proteína específica en una mezcla compleja de proteínas puede llevarse a cabo mediante el empleo de esta técnica. En una mezcla de proteínas separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS las bandas de proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa por electroforesis y las bandas de proteínas individuales son identificadas sumergiendo la membrana de nitrocelulosa con

un Ac policlonal o monoclonal marcado radiactivamente o con enzimas, lo que permite identificar la proteína de interés.

El complejo Ag-Ac que forma es visualizado por una autoradiografía o mediante los reactivos que precipitan la enzima que fue acoplada al Ac utilizado en este método. Si el Ac específico marcado no está disponible el complejo Ag-Ac puede ser detectado añadiendo un segundo Ac que puede estar marcado enzimáticamente o radiactivamente.

## PREPARACION DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

### ELISA

#### Solución amortiguadora de carbonatos ph=9.6

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.....1.59 g

NaHCO<sub>3</sub>.....2.93 g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH antes de aforar a 1 L.

#### Solución amortiguadora fosfato salina ph= 7.2 (PBS)

KCl.....2 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....1.2g

NaCl.....8.0g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....11.44g

Disolver en 900 ml de agua desionizada, ajustar el pH 7.2 y aforar a 1 L.

#### PBS -Tween 0.05%

PBS.....1 L

Tween 20.....500µl

#### Albúmina al 1% en PBS-Tween 0.05%

PBS- Tween 0.05 %.....1L

Albúmina.....10g

**Albúmina al 3% en PBS-TWEEN 0.05%**

PBS- Tween 0.05 Albumina %.....1Lt

Albúmina.....30g

**Amortiguador de citratos (0.1 M pH=5.0)**

$C_6H_5Na_3O_7$ .....29.4g

Disolver en agua destilada y ajustar el pH con ácido fosfórico antes de aforar a 1L

Conservar a 4<sup>0</sup> C.

**REVELADOR**

OFD.....0.004g

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....50 µL

Amortiguador de citratos.....10 ml



Cromatografía de afinidad

**Amortiguador de unión 0.01 M de fosfato de sodio (pH 7.0), 0.15 M Cloruro de sodio**

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O.....0.53 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....0.87 g

NaCl .....8.77 g

H<sub>2</sub>O desionizada.....1000 ml

Se disuelven en un volumen de 900ml y se lleva a un volumen final de 1000 ml de agua deionizada.

**Amortiguador de elusión 0.1 M de Glicina-HCl (pH 2.6)**

Glicina.....7.51 g

H<sub>2</sub>O desionizada.....1000ml

HCl 5N.....para ajustar pH a 2.5

Se disuelve la glicina con 900 ml de H<sub>2</sub>O desionizada se ajusta el pH con HCl 5 N y lleva a un volumen final de 1 L

**Amortiguador de limpieza 1.0 M de Ácido acético (pH 2.4)**

Ac. Acético.....57 ml

H<sub>2</sub>O desionizada.....943ml

**Cloruro de sodio 0.05% de timerosal**

Amortiguador de unión.....1000 ml

Timerosal.....0.5 g

A 1000ml de amortiguador de unión se agrega el timerosal y se disuelve

## Electroforesis

En este trabajo se preparó un gel de acrilamida al 12 % y se ensablo la cámara de electroforesis de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se prepararon diferentes soluciones de acuerdo a la siguiente tabla:

Reactivo	Concentrador 4%	Separador 12%
Monómeros	0.268 ml	2 ml
Regulador pH	0.5 ml pH 6.8	1.25 ml pH 8.8
SDS 10%	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l
APS	10 $\mu$ l	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	1.22 ml	1.675 $\mu$ l
TEMED	1.5 $\mu$ l	1.875 $\mu$ l

## Reactivos

### Solución de monómeros (30% T, 2.7 Cbis)

Acrilamina.....58.4 g

Bisacrilamida.....1.6 g

Aforar a 200ml con agua bidestilada. Disolver, filtrar y mantener en refrigeración, libre de la exposición a la luz.

**Regulador del gel separador, Tris-Cl 1.5 M, pH 8.8.**

Tris-HCl.....36.3 g

Aforar a 200ml con agua bidestilada. Disolver la sal, ajustar el pH a 8.8 con HCl 1N y aforar al volumen indicado. Mantener en refrigeración.

**Regulador del gel concentrador, Tris-Cl 0.5 M, pH 6.8**

Tris-Hcl.....3 g

Aforar a 50 ml con agua bidestilada. Proceder de la misma manera que con el regulador anterior.

**Solución acuosa de SDS al 10 %**

**Iniciador:** solución acuosa de persulfato de amonio de preparación reciente (preparar antes de usar)

**Catalizador:** TEMED (N,N,N',N'-tetrametilendiamina).

**Regulador** para la muestra 2x (Glicerol al 29 %, 2-mercaptoetanol al 10 % SDS al 4%, regulador Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, azul de bromofenol).

Glicerol.....2.0 ml

2-mercaptoetanol.....1.0ml

SDS.....4.0 ml(solución 4)

Regulador Tris-Cl.....2.5 ml (solución 3)

Aforar a 10 ml con agua bidestilada y adicionar una pizca de azul de bromofenol.

**Regulador de corrimiento** (Tris.Cl 0.025 M, pH 8.3., glicina 0.192 M, SDS al 1%)

Tris-Cl.....12.0 g

Glicina.....57.6 g

SDS.....40.0(solución 4).

Aforar a un litro con agua bidestilada. El regulador es un "stock" concentrado que deberá diluirse 1: 4 para su uso.

Tabla de porcentaje de acrilamida en función de peso molecular de las proteínas por separar.

Acrilamida	Peso molecular
8%	40-200 kD
10%	21-100 kD
12%	10-40 kD

## Electrotransferencia

### Regulador de transferencia

Tris-Cl 0.025 M

Glicina 0.192M

Metanol 20%

### Inmunoblots

#### **PBS- Tween 0.1 %**

PBS.....1 L

Tween 20.....1000µl

#### **Albúmina al 1% en PBS- Tween 0.1 %**

PBS- Tween 0.1 %.....1L

Albúmina.....10g

#### **Albumina al 3% en PBS- Tween**

PBS- Tween 0.1 %.....1L

Albúmina.....30g

## Revelador

4 cloronaftol.....3mg

MeOH.....1ml

PBS.....4ml

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....10