

## PRUEBA DE PEROXIDASA - ANTIPEROXIDASA EN ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

MIGUEL GUZMAN,\* SANDRA DE JARAMILLO,\*\*

Se estudió y estandarizó la técnica de Inmunoperoxidasa-Antiperoxidasa (PAP) para la investigación de Anticuerpos Antinucleares (AAN). Se estudiaron por esta técnica 70 sueros de pacientes referidos para estudio de Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Se encontró que 56 fueron negativos, 7 dieron títulos por debajo de los límites significativos y por tanto fueron considerados negativos y 7 dieron títulos de 1:160 y 1:640. Los resultados fueron concordantes con los arrojados por los estudios de inmunofluorescencia. Se pudo demostrar que la técnica de peroxidasa antiperoxidasa es una técnica sensible y específica en la investigación de Anticuerpos-Antinucleares pero desventajosa frente a la Fluorescencia por su gran complejidad técnica.

### INTRODUCCION

La posibilidad de determinar en un huesped la presencia de anticuerpos específicos contra antígenos específicos, y por tanto establecer un diagnóstico indirecto y seguir el curso de tales anticuerpos ha sido estudiada con distintos sistemas. En el estudio y evaluación de las enfermedades del tejido conectivo (Lupus Eritematoso Sistémico, Artritis Reumatoidea, Escleroderma, Enfermedades Conectivas Mixtas), el estudio de los anticuerpos antinucleares (AAN), por inmunofluorescencia es sin duda la prueba más sensible y mejor estandarizada (1).

Explorando otras posibilidades para estudiar estos anticuerpos se decidió utilizar la técnica de Peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) (2) con el propósito de determinar:

1. Su facilidad técnica.
2. Su sensibilidad y especificidad.
3. Sus ventajas o desventajas frente a la inmunofluorescencia.

### MATERIALES Y METODOS

#### *Sueros Problema:*

Se emplearon sueros de pacientes referidos a la Unidad de Inmunología Clínica del Instituto Nacional de Salud para estudio, con diagnóstico presuntivo de enfermedad del tejido conectivo.

#### *Reactivos de Inmunofluorescencia:*

Se utilizaron los reactivos estandarizados por el Instituto Nacional de Salud para este tipo de pruebas.

#### *Substrato:*

Tanto para las pruebas de AAN por inmunofluorescencia como para PAP se utilizaron cortes de hígado de ratas Wistar provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Salud.

\* Jefe Sección de Diagnóstico, Investigación y Referencia del Instituto Nacional de Salud. Profesor Asociado de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia.

\*\* Unidad de Inmunoquímica. Grupo de Microbiología e Inmunología. Instituto Nacional de Salud. Bogotá, Colombia.

*Antisueros:*

- a. Suero anti-IgG humana obtenido en cabra.
- b. Suero anticabra obtenido en conejo.
- c. Suero antiperoxidasa obtenido en cabra.

Todos ellos producidos y estandarizados por la Unidad de Inmunoquímica.

*Peroxidasa:*

Para todas las determinaciones se utilizó una preparación Peroxidasa Tipo VI (Sigma No. P-8375).

*Obtención de la Muestra:*

A todo paciente referido al Instituto para estudio de anticuerpos antinucleares se le tomó una muestra de 10 ml. de sangre mediante un sistema "Venojet". Se abrió para cada muestra una hoja de registro de los datos pertinentes. Luego de la retracción del coágulo, se separó el suero asépticamente, se centrifugó, se adicionó 1 mg/ml de azida de sodio y finalmente se almacenó a 4°C. Los sueros, una vez procesados, para investigación de AAN por inmunofluorescencia en la Unidad de Inmunología Clínica, fueron procesados para determinar la presencia de anticuerpos antinucleares por la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa.

*Prueba de Peroxidasa:*

Se utilizó la técnica descrita por Sternberg (2) modificada por Holubar y Wolff (3). Los cortes de hígado de rata *Wistar* de un mes de edad, fueron obtenidos por crióstato; se utilizaron cortes de tres micras los cuales se montaron en láminas porta-objetos específicamente diseñados para el caso (Figura No. 1), y se utilizaron frescos y sin fijar.

Los sueros se procesaron haciendo hasta 10 diluciones seriadas, al doble, a partir de 1:10 usando como diluyente solución salina buffer pH 7.2. Los controles consistieron en suero reactivo conocido, un suero negativo y un control de coloración en el que, en vez de suero, se utilizó solución salina.

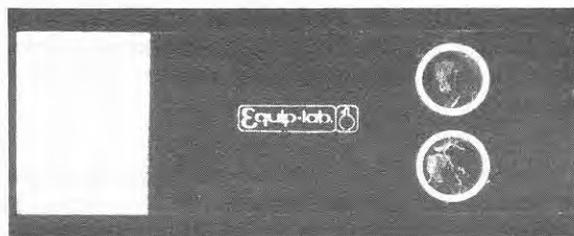


Figura 1. La gráfica muestra la disposición por duplicado de los cortes de hígado de rata. Este diseño del porta-objeto facilita grandemente la ejecución de los cortes con criostato.

Las láminas con los cortes fueron colocadas en un soporte de madera y después de mantenerlas al ambiente, por treinta minutos, se cubrió cada corte con suero normal de cabra, que, de acuerdo con lo recomendado por varios autores (3, 4, 5) evita reacciones de inespecificidad. Cada preparación fue cubierta luego con la respectiva dilución, tanto de los sueros problema como de los controles; luego de una incubación en cámara húmeda por treinta minutos a temperatura ambiente, se retiró el exceso de suero dejándolo caer libremente sobre servilletas de papel y se lavaron las láminas, colocadas cuidadosamente en un soporte, en solución salina buffer pH 7.2 por diez minutos. Enseguida se cubrieron las preparaciones, nuevamente colocadas en el soporte de madera, con un antisuero anti-IgG humana obtenido en cabra y previamente titulado para contener 8 U. precipitantes por ml., y se cumplió el proceso de incubación y lavado en forma idéntica al paso anterior.

En el paso siguiente las preparaciones fueron tratadas con un suero anti-cabra no diluido, obtenido en conejo y sometidas al procedimiento de los anteriores pasos.

Luego se trataron las preparaciones con un suero anti-peroxidasa obtenido en cabra; se utilizó una dilución 1:8. En el paso final se cubrieron las preparaciones con peroxidasa en una concentración de 25 mg/ml. Luego de la incubación adecuada y subsiguiente lavado se procedió a fijar las preparaciones en una solución de gluteraldehído 1,25% por un

tiempo crítico de 15 minutos, transcurridos los cuales, se lavaron cuidadosamente con solución salina tamponada, buffer por diez minutos.

Para revelar la reacción de la peroxidasa se utilizó el procedimiento de Graham y Karnovsky (6) usando el revelador preparado minutos antes (7). Este reactivo se colocó cuidadosamente sobre cada uno de los cortes y se dejó actuar por un máximo de 15 minutos, al término de los cuales se lavó con buffer de Tris-HCl. 0.5 M pH 7.6 por diez minutos. Luego se montaron las preparaciones con líquido de montaje consistente en una mezcla de nueve partes de solución salina buffer y una parte de glicerol y se cubrieron con laminillas.

La lectura de las preparaciones se hizo observándolas al microscopio de luz, con objetivo seco 40X. Se consideró positiva una prueba cuando se tuvo una coloración carmelita intensa y homogénea del núcleo o de su periferia en por lo menos el 90% de los núcleos (Fig. No. 2) y negativa cuando la preparación presentó una coloración pálida de todo el campo (Fig. No. 3). Todas las pruebas se realizaron por triplicado con el fin de asegurar su reproducibilidad. Los resultados se anotaron cuidadosamente en los formularios ad-hoc, para su análisis.

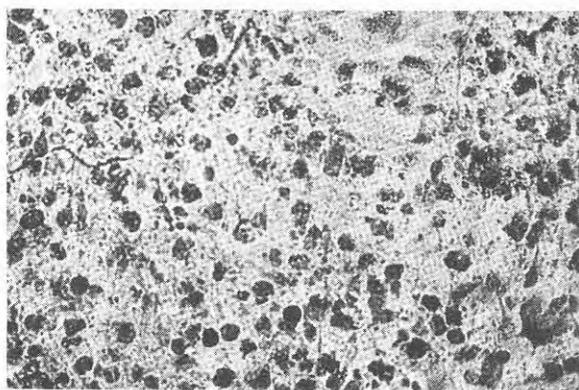


Figura 2. Fotografía de una preparación positiva para anticuerpos antinucleares por la técnica de la Peroxidasa-anti-peroxidasa. Obj. 40X.



Figura 3. La fotografía muestra una preparación negativa para anticuerpos antinucleares por la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa (Obj. 40X).

#### Resultados:

De los setenta sueros estudiados que llenaron los requisitos de calidad exigidos, siete presentaron inequívocamente pruebas positivas a título de 1:160 a 1:640; siete tuvieron reacción positiva, tres en dilución 1:20 y cuatro en dilución 1:40. Estas fueron consideradas como negativas, en razón de que las reacciones se tomaron como falsas positivas toda vez que la prueba se hizo negativa en las diluciones sub-siguientes; cincuenta y cuatro sueros fueron francamente negativos.

Al confrontar los resultados obtenidos en esta prueba con los obtenidos por quienes practicaron inmunofluorescencia, se pudo apreciar la concordancia entre ambos procedimientos (cuadro No. 1), tanto para los casos francamente negativos, como para los positivos. Esta concordancia fue tanto cualitativa como cuantitativa. Los casos falsos positivos, pero fácilmente dilucidados como negativos, en la prueba de peroxidasa, fueron negativos a la inmunofluorescencia.

#### DISCUSION:

la técnica de la peroxidasa cuyo fundamento radica en la posibilidad de revelar la presencia de esta enzima mediante su substrato natural  $H_2O_2$ , fue introducida

PRUEBA DE PEROXIDASA - ANTIPEROXIDASA EN ANTICUERPOS ANTINUCLEARES

CUADRO No. 1

COMPARACION ENTRE INMUNOPEROXIDASA E INMUNOFLUORESCENCIA, EN 70 SUEROS PARA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

Inmunoperoxidasa.

INMUNO-FLUORESCENCIA	NO REACTIVO	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
NO REACTIVO	56	3 *	4 *				
1:10							
1:20							
1:40							
1:80							
1:160					1		
1:320						4	
1:640							2

\* Sueros positivos hasta 1:40 se consideran inespecíficos.

Nº Total de Sueros : 70 ; Nº de Sueros Positivos : 7.

como una prueba promisoría en Inmunoquímica para utilizarla mediante la conjugación con un anticuerpo específico que, al unirse con su antígeno homólogo fija la enzima permitiendo por tanto determinar que la reacción ha tenido lugar (Fig. No. 4). Debido a los problemas de inespecificidad que esta técnica presenta, informados por muchos autores (5, 8, 9) se pensó en la posibilidad de hacer esta prueba más versátil utilizando una cadena de antisueros que incluyera un anticuerpo intermedio que dirigido específicamente contra una inmunoglobulina de cabra, tomase por una parte una molécula de inmunoglobulina de cabra dirigida contra la inmunoglobulina humana y de otro lado una molécula de inmunoglobulina de cabra dirigida específicamente contra peroxidasa tal como lo muestra la figura No. 5. En esta forma se obviaría el uso de los conjugados. Aunque la técnica aquí utilizada muestra una sensibilidad y especificidad comparables a la inmunofluorescencia, presenta sin embargo un grado de complejidad muy grande por cuanto los diferentes antisueros utilizados para establecer la cadena inmunológica, deben tener una titulación crítica ya que mínimas variaciones de concentración producen resultados inconsistentes; así por ejemplo se requiere que el suero

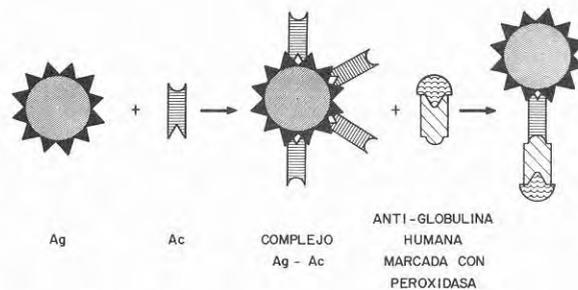


Figura 4. La figura representa los pasos fundamentales de la técnica de inmunoperoxidasa.

antihumano obtenido en cabra deba estar en una adecuada dilución, frente al suero anti-cabra en conejo, para permitir que éste deje grupos de combinación libres que puedan reaccionar con el suero antiperoxidasa en cabra, de otra manera todos los grupos reaccionarían y las siguientes fases de la reacción no se sucederían dando una reacción negativa (Fig. No. 6). Los cortes de hígado de rata deben ser frescos, de no más de tres días, cortes de mayor tiempo dan reacciones inconsistentes. Otros aspectos técnicos, incluyen la fijación con gluteraldehído cuyo tiempo es crítico ya que en un

tiempo ligeramente mayor bloquea la difusión de la enzima (9).

Por todo esto la peroxidasa-antiperoxidasa para detección de AAN cuya ventaja

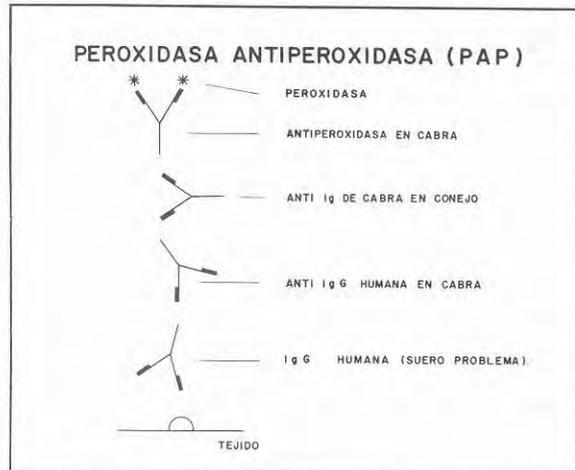


Figura 5. La figura representa los pasos fundamentales de la técnica de peroxidasa-antiperoxidasa, utilizando una cadena de anticuerpos.

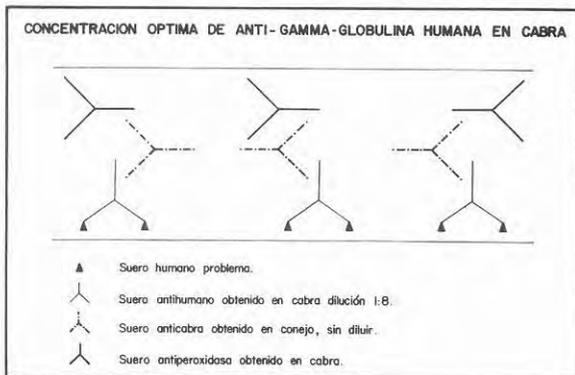


Figura 6. Se considera que un suero anti-gammaglobulina humana, obtenido en cabra, que contenga 8 unidades precipitantes por c.c., constituye la dilución óptima para la reacción, porque permite que el suero anticabra obtenido en conejo reaccione en puente con el suero antiperoxidasa, sueros sin diluir o a diluciones más bajas que esta bloquean la reacción.

aparente sería la eliminación del equipo de fluorescencia, la hace impracticable para laboratorios pequeños que sería en donde tendría su ubicación y la confinaría a laboratorios centrales en donde una cuidadosa estandarización podría realizarse. Es por ello que estos resultados nos permiten no aceptar con el optimismo con que otros autores recomiendan esta técnica para microscopía de luz y en procedimientos de rutina (2-11).

Por tanto creemos que esta técnica debe considerarse apenas como una posibilidad experimental.

CONCLUSIONES:

1. La técnica de peroxidasa-antiperoxidasa tiene un alto grado de complejidad si se compara con la técnica de inmunofluorescencia para determinación de anticuerpos antinucleares.

2. Adecuadamente estandarizada es tan sensible y específica como la prueba de inmunofluorescencia.

3. La ventaja de utilizar un microscopio de luz, a diferencia de la inmunofluorescencia que requiere un equipo muy costoso se pierde frente al hecho de requerir un mayor número de reactivos inmunológicos los cuales deben ser cuidadosamente estandarizados y de aumentar considerablemente el tiempo para su realización.

SUMMARY

The immuno-peroxidase-antiperoxidase technique (PAP), was studied and standardized to detect antinuclear-antibodies (ANA). Sera from 70 patients suspected to suffer systemic eritematous lupus (SEL) were studied by this technique. 56 sera were negative, 7 showed titers 1:10 - 1:40 considered negatives and 7 were positives given titers 1:160 to 1:640. These results were in complete agreement with those obtained by immunofluorescence.

It was posible to demonstrate that the peroxidase-antiperoxidase technique has a

high degree of sensitivity and specificity to detect-antinuclear antibodies but compared with the immunofluorescent procedures it has the disadvantage of its great technical complexity.

#### AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestros agradecimientos a todas las entidades que nos refirieron pacientes para estudio. Igualmente a Constanza Peña de la Unidad de Inmunología Clínica por su cooperación y a la dibujante Angela Quintero Tovar por la confección de las figuras y los cuadros.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Cavallaro JJ, Palmer DF, Bigazzi PE. Immunofluorescence Detection of Autoimmune Disease. 1976; Immunology Series No. 7 U.S. Department of Health, education, and Welfare. Public Health Service. Center for Disease Control. Atlanta. Georgia.
2. Sternberger LP, Petrali JP. The unlabeled antibody method. Attempted use of peroxidase-conjugated antigen as the third layer in the technique. J. Histochem, Cytochem. 1977; 25:1036.
3. Holubar K, Wolf K, Konrad K, Beuthner EH. Ultra structural Localization of Immunoglobulins in bullous Pemphigoid skin. J. Inves. Dermat. 1975; 64: 220.
4. Busachi CA, Ray MB, desmet VJ. An immunoperoxidase technique for demonstrating membrane localized HBs Ag. in paraffin sections of liver biopsies. J. Immunol. Meth. 1978; 19:95.
5. Zehr DR. Use of hidrogen peroxide-egg albumin to eliminate non specific staining in immunoperoxidase techniques. J. Histochem. Cytochem. 1978; 26:415.
6. Graham R, Karnovsky MJ. The early stages of absorbtion of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney. Ultraestructural cytochemisty by a new technique. J. Histochem. Cytochem. 1966; 14:291.
7. Essner E. Hemoproteins. In Electron Microscopy of Enzyme. Principles and Methods. M.A. Hayat Editor. 1974. Vol. 1: 1-33 Van Nostrand Reinhold Co. New York.
8. Morrissey RL, Zolock DT, Bucci TJ, Bikle DD. Immunoperaxidase localization of vitamin D dependent calcium binding protein. J. Histochem. Cytochem. 1978; 26:628.
9. Minard BJ, Cawley LP. Use of horseradish peroxidase to block non specific enzyme uptake in immunoperoxidase microscopy. J. Histochem. Cytochem. 1978; 26:628.
10. Rosene DL, Mesulam MM. Fixation variables in horseradish peroxidase neurohistochemistry. I. The effects of fixation time J. Histochem. Cytochem. 1978; 26:28.
11. Beckett J, Bigbee J. Immunoperoxidase localization of *Treponema pallidum*. Arch. Pathol. Lab. Med. 1979; 103:135.