



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana
ISSN: 0325-2957
actabioq@fbpba.org.ar
Federación Bioquímica de la Provincia de
Buenos Aires
Argentina

Nicolás, Juan C; Grumelli, Yanina A
Método ELISA para anticuerpos antimicrosomales hígado-riñón
Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 38, núm. 1, enero-marzo, 2004, pp. 23-27
Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires
Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53538104>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Método ELISA para anticuerpos antimicrosomales hígado-riñón*

► Juan C. Nicolás¹, Yanina A. Grumelli²

1. Bioquímico Especialista en Química Clínica y Gastroenterología; Cátedra de Análisis Clínicos, Facultad de Cs. Qs.; U.C.C.
E-mail: juancanico@hotmail.com

2. Bioquímica; Cátedra de Análisis Clínicos, Facultad de Cs. Qs.; U.C.C.
E-mail: yanigrumelli@arnet.com.ar

* Facultad de Ciencias Químicas; Campus Universitario, Cno. Alta Gracia Km. 10.
Tel./Fax: 54-0351-4938060.

Resumen

Hace algo más de dos décadas se describió un nuevo tipo de hepatitis crónica autoinmune, denominada Hepatitis Autoinmune Tipo 2. Esta forma se presenta más frecuentemente en niñas y mujeres jóvenes y se caracteriza por la presencia de autoanticuerpos séricos anti microsomas de hígado/riñón tipo 1 (LKM-1). El antígeno blanco de los LKM-1 es la Citocromo P450 Monooxigenasa (P450IID6), enzima microsómica de 50 kDa que metaboliza fármacos. Este antígeno también puede expresarse en la membrana celular de los hepatocitos modulado por interleukinas y factor de necrosis tumoral (TNF). El método más frecuente para determinar anticuerpos anti LKM-1 es la inmunofluorescencia indirecta, utilizando cortes de hígado y riñón de rata. El principal inconveniente es el patrón similar que presentan otros autoanticuerpos denominados Antimitocondriales (AMA). En el presente trabajo, se desarrolla un *test* para LKM utilizando un enzoinmunoensayo (ELISA), a partir de microsomas extraídos de hígado de rata. Los Coeficientes de Variación Intraensayo para dos niveles de significación, muestras LKM-negativas y LKM-positivas resultaron de 12,5% y 8,7%, respectivamente. La sensibilidad y la especificidad fueron del 100% y 97,5%, respectivamente, para las muestras ensayadas.

Palabras clave: hepatitis autoinmune * anticuerpos antimicrosomales hígado/riñón * microsomas * inmunofluorescencia * enzoinmunoensayo * inunoblot.

Summary

ELISA METHOD FOR ASSESS LIVER - KIDNEY MICROSOMES ANTIBODIES

Almost twenty years ago a new type of autoimmune chronic hepatitis, denominated Type 2 Autoimmune Hepatitis was described. It is more frequent in girls and young women, characterized by the presence of serum autoantibodies liver/kidney anti microsomes type 1 (LKM-1). A microsomic enzyme of 50 kDa, the Cytochrome P450 Monooxygenase (P450IID6) metabolizes drugs and is the target antigen of the LKM-1. This antigen can also be expressed in the cellular membrane of the hepatocytes modulated by interleukines and tumoral necrosis factor (TNF). The most frequent method to determine antibodies anti LKM-1 is the indirect immunofluorescence, using liver and kidney rat slides. The main inconvenience is the

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

similar pattern that they present with other antibodies denominated Antimitochondrial (AMA). In this work, a test for LKM is developed using an Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), starting from extracted liver rat microsomes. The Interassay Variation Coefficients for two significance levels, both negative and positive-LKM samples were respectively 12.5% and 8.7%. Sensibility and specificity were 100% and 97.5% respectively for both samples.

Key words: Autoimmune hepatitis * autoantibodies anti liver/kidney microsomes * microsomes * immunofluorescence * enzimoimmunoassay * immunoblot.

Introducción

La hepatitis autoinmune (HAI) es una inflamación hepatocelular autopropagante de causa desconocida (1). El examen histológico se caracteriza por la presencia de hepatitis periportal (necrosis en sacabocados o hepatitis de interfase) (2).

En el análisis bioquímico del suero, puede constatare hipergammaglobulinemia (IgG) y autoanticuerpos asociados con el hígado (1) (2). Los tipos principales de autoanticuerpos circulantes son antinucleares (ANA), anti músculo liso (ASMA) y los rarísimos anti-microsomales hígado/riñón tipo 1 (LKM-1) dirigidos contra la Citocromo P450 Monooxigenasa (P450IID6) (1) (3-6). El diagnóstico requiere la exclusión de otras enfermedades hepáticas crónicas de aspecto similar, como la enfermedad de Wilson; hepatitis viral crónica; deficiencia de α_1 -antitripsina; hemocromatosis; hepatopatía inducida por fármacos; esteatohepatitis no alcohólica y las colangiopatías inmunes de la cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria y la colangitis autoinmune (1) (7).

Se han propuesto tres tipos de subclasificaciones para la hepatitis autoinmune, sobre la base de los marcadores inmunoserológicos hallados (1). Hepatitis autoinmune tipo 1, positividad para anticuerpos antinucleares (ANA) y anticuerpos antimúsculo liso (ASMA); hepatitis autoinmune tipo 2, positividad para anticuerpos anti microsomales hígado/riñón tipo 1 (LKM-1) y rara vez combinados con anticuerpos antinucleares (ANA); y por último, hepatitis autoinmune tipo 3, positividad para anticuerpos anti antígeno hepático soluble (SLA) y anti hígado/páncreas (LP) (1) (8).

La frecuencia de los subtipos es notable, siendo de casi el 90% para la HAI-1 y de muy baja prevalencia los otros dos subtipos (1) (9). La presentación de HAI-2 queda prácticamente restringida a mujeres jóvenes (2-14 años), resultando rara en adultos (4% de los casos) (5).

Se ha descrito positividad de anticuerpos anti LKM-1 en pacientes con hepatitis producida por virus C (HCV) y virus D (HDV), aunque el epítopo reconocido por estos autoanticuerpos resulta diferente del que reacciona con los anti LKM-1 de la HAI-2 (10).

La manera más difundida de poner en evidencia estos anticuerpos en muestras de suero, es la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la cual tiene sensibilidad y especificidad aceptables, si es realizada por un operador entrenado (6) (11).

La determinación de anticuerpos anti hígado/riñón de tipo 1 por la técnica de ELISA, es un método sensible y más específico que la técnica de inmunofluorescencia indirecta, al eliminar la subjetividad de la interpretación por parte del operario.

Materiales y Métodos

PLACAS PARA ELISA

Placas para ELISA (alta capacidad de adsorción) (MAXISORP; NUNC, Alemania).

EQUIPO INCUBADOR/LAVADOR Y LECTOR DE PLACAS

"Hyperion" de Organon Teknika (Bélgica).

OBTENCIÓN DEL ANTÍGENO

Hígado de ratas jóvenes albinas. Se sacrificaron 2 animales de manera rápida e incruenta. Los hígados fueron extraídos, cortados en pequeños trozos y lavados con *Buffer* Fosfato Salino (PBS) durante 30 min. Luego se decantó la solución de lavado y se agregaron 2 mL de PBS. Los hígados fueron macerados mediante ultrasonido. Este macerado se trasvasó a un tubo de centrifuga que contenía 8 mL de Solución de Sucrosa 0,25 M, y se centrifugó a 3.000 r.p.m. durante 10 min para sedimentar restos de tejidos y núcleos celulares. El sobrenadante se sometió nuevamente a centrifugación a 9.000 r.p.m. durante 20 min para separar mitocondrias. Por último, el sobrenadante se centrifugó nuevamente durante 120 min a 12.000 r.p.m. para obtener el *pellet* rico en microsomas. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en *Buffer* Fosfato Salino. Se determinó el contenido proteico mediante la reacción de Bradford como indica la téc-

nica. La concentración se ajustó a 1,8 µg/100 µL (Antígeno de Trabajo) por dilución con *buffer* de dilución de antígeno.

El antígeno fue fraccionado y conservado a -20 °C hasta su utilización.

SOLUCIÓN DE DILUCIÓN DEL ANTÍGENO Y DE LAS MUESTRAS

Buffer Tris (50 mM); NaCl (150 mM); pH = 7,5.

SOLUCIÓN DE BLOQUEO

Buffer Tris (50 mM); NaCl (150 mM) y 10 g/L de BSA; pH = 7,5.

SOLUCIÓN DE LAVADO

Buffer Fosfato Salino (PBS). NaCl: 8,75 g/L; Na₂HPO₄ · 2 H₂O: 1,48 g/L; KH₂PO₄: 0,48 g/L; pH = 7,2.

ANTICUERPO SECUNDARIO

Anticuerpos anti Gamma Globulina Humana marcados con Peroxidasa (ABBOTT LABORATORIES, USA), diluidos según indicación del fabricante.

SUSTRATO/CROMÓGENO

Peróxido de Hidrógeno/Tetrametilbencidina (TMB) 100 mg/L de TMB y 0,15 mL/L de H₂O₂ en *buffer* Ácido Cítrico 0,1 M/Fosfato Disódico 0,2 M; pH = 6.

SOLUCIÓN STOPPER

Ácido Sulfúrico 1M en agua destilada.

MUESTRAS

Se incluyeron en el estudio 30 muestras de suero pertenecientes a individuos normales (n = 30). Las mismas pertenecían a 16 personas de sexo femenino (53,3%) y 14 de sexo masculino (46,7%); el rango de edades fue de 13-85 años (X = 45,4 años) (Tabla I).

Otro grupo poblacional comprendió 30 muestras de suero (n = 30) que presentaron positividad por inmunofluorescencia en alto título (> 1:80) para otros tipos de autoanticuerpos (ANA, nDNA, ASMA, AMA, AGA, EMA) (Tabla II).

Un tercer grupo de 30 muestras perteneció a pacientes diagnosticados con infección por virus de la hepatitis C (HCV) por ELISA y RIBA Test (n = 30) (Tabla III).

Por último, se incluyeron 15 muestras LKM positivas (n = 15), diagnosticadas por inmunofluorescencia y confirmadas por inmunoblot (EUROIMMUN, GMBH; Alemania) (Tabla IV).

Todas las muestras de suero fueron obtenidas sin conservantes, de la manera habitual, guardadas en alícuotas de 1 mL a -20 °C hasta su procesamiento, el cual se realizó antes de 30 días. El procesamiento de las muestras fue realizado por duplicado de la manera indicada.

Métodos

Las placas se sensibilizaron por incubación con 100 µL del Antígeno de Trabajo durante 2 h a 37 °C y luego durante toda la noche a 4 °C. Se aspiró el contenido de la placa. El bloqueo de los sitios residuales se realizó por incubación con 150 µL de Solución Bloqueante durante 1 h a 37 °C. Nuevamente se aspiró el contenido de la placa y se lavó 5 veces con 300 µL de solución de lavado.

Las muestras fueron diluidas 1:10 (100 µL de muestra + 900 µL de solución diluyente para muestras). Se incubaron 50 µL de la dilución durante 1 h a 37 °C. Se aspiró el contenido de la placa y se lavó 5 veces con 300 µL de solución de lavado.

Se incubaron durante 30 min 50 µL de la dilución de Anticuerpos anti Gamma Globulina Humana marcados con Peroxidasa. El contenido de la placa fue aspirado y se realizaron 5 lavados con 300 µL de solución de lavado.

El revelado se realizó por incubación durante 30 min con 100 µL de mezcla Sustrato-Cromógeno. La reacción se detuvo por adición de 100 µL de solución *Stopper*.

Se realizó la lectura del color desarrollado a 450 nm antes de 20 min.

Los cálculos de Coeficiente de Variación Intraensayo se realizaron utilizando dos niveles de significación. El primer nivel de significación se realizó sobre una muestra LKM negativa, el segundo fue para una muestra LKM positiva. Ambas fueron ensayadas 10 veces, calculando media y desviación estándar de las lecturas de absorbancia obtenidas (Tabla VI).

Para evaluar sensibilidad y especificidad del *test* de ELISA para anticuerpos Anti LKM se analizaron 40 muestras, de las cuales quince eran LKM-positivas y veinticinco LKM-negativas. Cada una fue ensayada por el método de ELISA desarrollado e inmunoblot (IMB) (Tabla VII).

Análisis estadístico

En el análisis estadístico se calculó media, rango, desviación estándar y coeficiente de variación. *Test* Chi² (χ^2) y *Test* de Student bilateral (*t*), un valor de *P* < 0,05 fue considerado significativo.

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando el programa de computación Graphpad INSTAT v2.05.

Resultados

Los resultados obtenidos en la determinación de anticuerpos antimicrosomales hígado/riñón (Anti LKM), para cada grupo de muestras, se detallan a continuación:

Tabla I. *Controles normales*

Muestras	Media (ABS)	D.E. (ABS)
N = 30	X = 0,085	D.E. = 0,018

Tabla II. *Autoanticuerpos Positivos (no LKM-1)*

Muestras	Media (ABS)	D.E. (ABS)
N = 30	X = 0,101	D.E. = 0,012

Tabla III. *HCV Positivos*

Muestras	Media (ABS)	D.E. (ABS)
N = 30	X = 0,116	D.E. = 0,023

Tabla IV. *LKM Positivos*

Muestras	Media (ABS)	Rango (ABS)
N = 15	X = 0,354	0,190 < X < 0,560

El valor de corte (*cutoff*) del ELISA para diferenciar muestras LKM-positivas y LKM-negativas se estableció como la media de los controles normales más un factor de 0,050 ($X_{(CN)} + 0,050$). Para establecer si existe diferencia estadísticamente significativa entre los 4 grupos de muestras, se realizó la comparación de poblaciones con el *Test* de Student (*t*) bilateral (Tabla V).

Tabla V. *Comparación estadística de grupos.*

Grupo	LKM (N = 15) versus GRUPO
Normales (N = 30)	DIF. SIGNIFICATIVA (P < 0,0001)
Autoanticuerpos (N = 30)	DIF. SIGNIFICATIVA (P < 0,0001)
HCV (N = 30)	DIF. SIGNIFICATIVA (P < 0,0001)

La media de lecturas de absorbancia del grupo de muestras LKM-positivas, arrojó una diferencia estadísticamente significativa respecto de las medias de las lecturas de absorbancia de los otros grupos.

Los cálculos del Coeficiente de Variación Intraensayo arrojaron un valor de 12,5% para las muestras LKM negativas (Controles Normales) y de 8,7% para las muestras LKM positivas (Tabla VI).

Tabla VI. *Coeficiente de Variación Intraensayo*

Nivel	Media (ABS)	D.E. (ABS)	C.V. %
LKM (-)	0,096	0,012	12,5
LKM (+)	0,300	0,026	8,66

En la siguiente tabla se detallan los resultados obtenidos por ELISA e Inmunoblot para las cuarenta muestras utilizadas para evaluar sensibilidad y especificidad de la técnica desarrollada.

Tabla VII. *Sensibilidad y Especificidad del ELISA*

	IMB (+)	IMB (-)	Total
ELISA (+)	15	1	16
ELISA (-)	0	39	39
TOTAL	15	40	55

Una de las muestras normales (LKM negativa) tomada al azar resultó positiva con el ELISA, si bien el valor de positividad (Absorbancia) fue bajo (Abs = 0,147) debe ser considerada como tal por el valor de corte asignado. Dicha muestra podría corresponder a uniones inespecíficas en el ELISA debido a la presencia de algún componente proteico no evaluado. Una solución sería elevar el valor de corte elegido a $X_{(CN)} + 0,1$.

La sensibilidad del ELISA correspondió a un 100% y la especificidad del *test* fue de 97,5%.

Conclusiones

En el presente estudio se eligió un grupo de pacientes con HCV, debido a la frecuencia de positividad que presentan para anticuerpos Anti LKM. Ninguno de los pacientes HCV evaluados presentó positividad para anticuerpos Anti LKM pero dos de ellos mostraron valores de Absorbancia por el método de ELISA en la zona de *cutoff*. Estos valores en la zona gris también podrían resolverse al aumentar el valor de corte.

El método de ELISA desarrollado con un antígeno natural de hígado de rata, permitió diferenciar los pacientes con anticuerpos Anti LKM (diagnosticados por técnica de IFI e Inmunoblot) de aquellas muestras normales (controles) y aquellas muestras que presentaban positividad para otro tipo de autoanticuerpos diferentes de los LKM.

El *test* correlaciona de manera excelente con los otros métodos diagnósticos aplicados para evaluar la presencia de anticuerpos Anti LKM (sensibilidad 100% y especificidad 97,5% contra el método de Inmunoblot), con la ventaja de eliminar la subjetividad atribuida a los métodos de inmunofluorescencia.

Los resultados del Coeficiente de Variación Intraensayo fueron aceptables considerando que se trata

de un procedimiento no comercial, por lo tanto pueden presentarse diferencias en la sensibilización de las placas. Asimismo, se sugiere efectuar en cada ensayo, controles positivos y negativos para minimizar las variaciones inherentes al *test*, aumentando la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados obtenidos.

AGRADECIMIENTOS

- Facultad de Ciencias Químicas, U.C.C. (Córdoba, Argentina)
- Bioq. Esp. Lyda B. Bísaro (Unidad de Hígado Córdoba, Córdoba, Argentina)
- IACA Laboratorios (Bahía Blanca, Argentina)
- Laboratorio Central, Hospital Italiano (Córdoba, Argentina)
- Laboratorio Análisis Clínicos Especializados -LACE- (Córdoba, Argentina)
- Laboratorio Central Sanatorio Allende (Córdoba, Argentina)

CORRESPONDENCIA

Dres. NICOLAS JUAN C., GRUMELI YANINA A.
Cátedra de Análisis Clínicos, Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Católica de Córdoba
Obispo Trejo 323
5000 CÓRDOBA, Argentina.

Referencias bibliográficas

1. Johnson P, McFarlane I. Meeting Report. International Autoimmune Hepatitis Group. *Hepatology* 1993; 18 (4): 998-1005.
2. Czaja A. Autoimmune Hepatitis: Evolving Concepts and Treatment Strategies. *Dig Dis Sci* 1995; 40 (2): 435-56
3. Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil S, et al. Chronic Active Hepatitis Associated with Antiliver/Kidney Microsome Antibody Type 1: A Second Type of "Autoimmune" Hepatitis. *Hepatology* 1987; 7 (6): 1333-9.
4. Manns M, Griffin K, Sullivan K, Johnson E. LKM 1 Autoantibodies Recognize a Short Linear Sequence in P450IID6, a Cytochrome P450 Monooxygenase. *J Clin Invest* 1991; 88 (4): 1370-8.
5. Czaja A, Manns M, Homburger H. Frequency and Significance of Antibodies to Liver/Kidney Microsome Type 1 in Adults with Chronic Active Hepatitis. *Gastroenterology* 1992; 103 (4): 1290-5.
6. Cavallaro J, Palmen D, Bigazzi, P. Immunofluorescent Detection of Autoimmune Diseases. *Immunology Series* N° 7, 1976; CDC, Atlanta GA.
7. Czaja, A. Autoimmune Hepatitis: Current Therapeutic Concepts. *Clin Immunother* 1994; 1: 413-29.
8. Czaja A, Manns M. The validity and Importance of Subtypes of Autoimmune Hepatitis: A point of View. *Am J Gastroenterol* 1995; 90 (8): 1206-11.
9. Crapper R, Bhathal P, Mackay I, Frazer I. Acute autoimmune hepatitis. *Digestion* 1986; 34 (3): 216-25.
10. Duclos-Valleé J, Hojoru O, Yamamoto A, Jacs-Aigrain, E, Alvarez F. Conformational epitopes on CYP2D6 are recognized by liver/kidney microsomal antibodies. *Gastroenterology* 1995; 108 (2): 470-6.
11. Guibault G. (Ed.) *Practical Fluorescence: Theory, Methods, and Techniques*. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1973.

Aceptado para su publicación el 6 de noviembre de 2003