

T 2017

A

L

L

E

R

E

S

de Formación

Metodología en autoinmunidad y algoritmos de trabajo: anticuerpos antinucleares y sus especificidades

Resumen del Taller de formación en Autoinmunidad impartido durante el pasado Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (25-27 mayo, Zaragoza). Durante la exposición se realizaron preguntas a la audiencia referentes a su metodología de trabajo, cuyos resultados estadísticos se mencionan en el artículo.

Introducción

La detección y cuantificación de autoanticuerpos es muy diferente a la medición de parámetros bioquímicos. La respuesta inmune es distinta en cada individuo, pudiendo existir varios enfermos con la misma patología autoinmune y distintos perfiles de autoanticuerpos. Además, la respuesta inmune es policlonal y el perfil de autoanticuerpos puede cambiar con el curso de la enfermedad, pues, una vez rota la tolerancia, aumenta la predisposición a sintetizar nuevos autoanticuerpos.

Existen diversas causas que van a condicionar las diferencias entre los ensayos o metodologías utilizadas en el laboratorio de autoinmunidad. La conformación de los epítomos es muy importante y debe preservarse en el método que se esté utilizando. Otro factor a tener en cuenta es la presencia de reacciones cruzadas entre diferentes autoantígenos relacionados con enfermedades autoinmunes o con otros antígenos de agentes infecciosos.

Metodología en el laboratorio de autoinmunidad

Todos los métodos utilizados en el

SUSANA LÓPEZ SAÑUDO¹, IRENE FERNÁNDEZ ALONSO²
Y LUIS FERNÁNDEZ PEREIRA²

¹Werfen, Diagnostic solutions for live, Línea de Autoinmunidad, Hospitalet de Llobregat, Barcelona

²Laboratorio de Inmunología y Genética Molecular, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres

laboratorio de autoinmunidad son métodos de inmunoensayo (basados en el reconocimiento antígeno-anticuerpo):

- IFI (Inmunofluorescencia Indirecta) o IFA (*ImmunoFluorescence Assay*).
- EIA (*Enzyme ImmunoAssay*): ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), FEIA (*Fluoro-Enzyme ImmunoAssay*) e inmunoblot.
- CIA (*Chemiluminescence ImmunoAssay*) o CLIA (*ChemiLuminescence ImmunoAssay*)
- Técnicas multiplex.

Los laboratorios de autoinmunidad utilizan varios de estos métodos y los facultativos deben ser conscientes de que pueden existir discrepancias.

En la [figura 1](#) podemos ver el rango de medida de

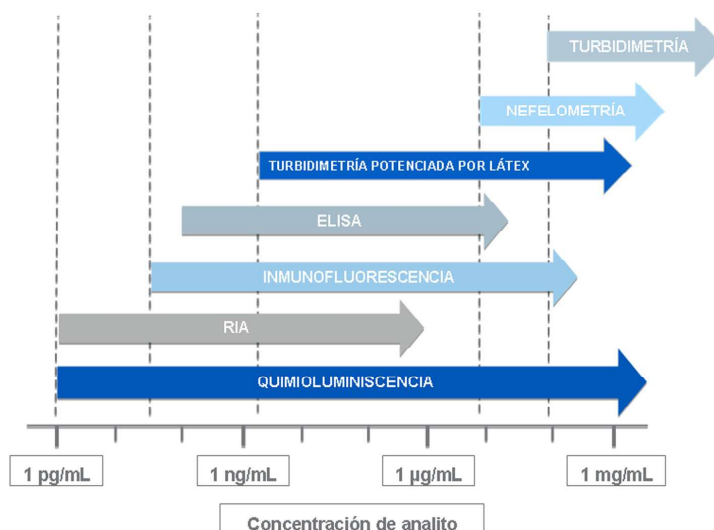


Figura 1. Rango de medida de diferentes tipos de inmunoensayos. (Figura modificada del original de David Giles, Manager del Departamento de Quimioluminiscencia de I+D. Biokit, Werfen).

diferentes tipos de inmunoensayos, algunos utilizados en el laboratorio de autoinmunidad.

Los diferentes métodos de inmunoensayo se diferencian en:

- Soporte al que se une el antígeno.
- Compuesto unido al conjugado.

El antígeno está en un portaobjetos, en el caso de la IFI; pocillo de una microplaca en el ELISA; membrana de nitrocelulosa en el inmunoblot; CAP de celulosa en el FEIA; partícula paramagnética en la CIA; y microesfera en las técnicas multiplex. Respecto al conjugado, en todos los casos es una anti-inmunoglobulina humana (IgG, IgA, IgM) unida al fluorocromo FITC en la IFI, a una enzima en el EIA (fosfatasa alcalina/ peroxidasa para ELISA e inmunoblot, y β -galactosidasa para el FEIA), a un compuesto quimioluminiscente en la CIA, o a un fluorocromo en las técnicas multiplex.

La IFI es una técnica sencilla en la que, durante la primera incubación, el suero diluido del paciente se incuba en los portaobjetos. Posteriormente hay un lavado para eliminar lo que no se ha unido, incubación con el conjugado, último lavado y visualización al microscopio de fluorescencia. Es conveniente incluir controles para verificar que la técnica ha transcurrido correctamente.

Respecto al ELISA, en autoinmunidad se utilizan varios tipos (indirecto, sándwich o de captura y competitivo). La enzima del conjugado cataliza

una reacción en la que el sustrato se convierte en un producto coloreado soluble, cuya densidad óptica (DO) se mide en el espectrofotómetro del analizador. En cada sesión hay que hacer una curva de calibración. Actualmente, todos los analizadores automáticos realizan la técnica y calculan los resultados.

En el caso del FEIA, la enzima del conjugado cataliza una reacción, generándose un producto fluorescente que se cuantifica en el fluorímetro del analizador. La calibración es estable 28 días.

En el **inmunoblot** el producto de la reacción es insoluble y precipita en la membrana de nitrocelulosa.

En la CIA, el conjugado lleva unido un compuesto quimioluminiscente que, al reaccionar con los activadores, produce emisión de luz que se cuantifica en el luminómetro del equipo. La calibración es estable varias semanas o por lote de reactivo^[1].

Respecto a las **técnicas multiplex**, las microesferas llevan diferentes proporciones de dos fluorocromos que determinan el tipo de partícula. El tercer fluorocromo va unido al conjugado y mediante dos láseres se detecta el tipo de partícula y se cuantifica. La calibración es estable varias semanas.

Cribado de anticuerpos antinucleares

Aunque la comunidad científica generalmente habla de anticuerpos antinucleares (ANA), todos somos conscientes de que nos referimos a

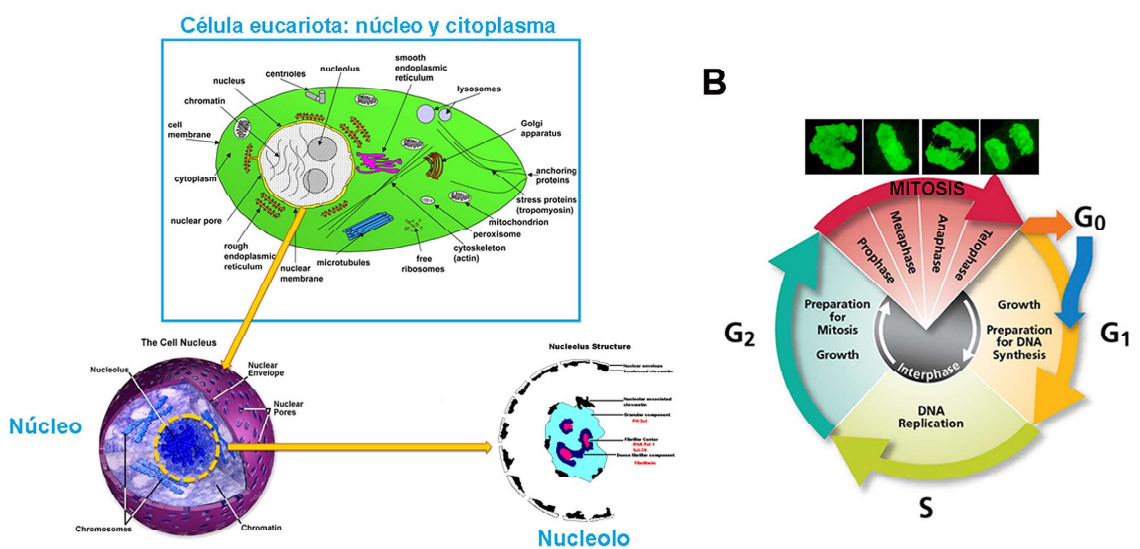


Figura 2. Concepto de anticuerpos antinucleares: núcleo, citoplasma y mitóticos [Figura combinada de: imagen de la célula, del Atlas of Hep-2 patterns, 3ª edición. A. R. Bradwell y R. G. Hugues, 2007; imagen del núcleo, suministrada por Susan Coople, Inova Diagnostics (micro.magnet.fsu.edu); e imagen del nucleolo, de Fluorescent ANAs and beyond!, Carol Pebbles, Inova Diagnostics, 2009]. **Figura 2B. Variación del patrón durante la mitosis** [Figura combinada de imagen del ciclo celular, suministrada por Susan Coople, Inova Diagnostics (Bdbiosciences.com) modificada con las imágenes IFA de cada etapa del ciclo celular.

anticuerpos anticelulares (núcleo, citoplasma y mitóticos, véase figura 2) [2].

Para el cribado de ANA se utiliza la IFI y los inmunoensayos en fase sólida (ELISA, FEIA, CIA y multiplex)., Consultados 71 de los facultativos presentes respecto al método de cribado de ANA utilizado, los resultados porcentuales fueron:

- El 69 %: IFI
- El 18,31 %: diferentes métodos en función del peticionario
- El 7,04 %: multiplex
- El 5,63 %: ELISA/FEIA o CIA.

Cribado de ANA por IFI

La IFI sobre células HEp-2 (células epiteliales procedentes de un laringioma humano) es el método gold standard recomendado por la ACR [3] (American College of Rheumatology) para el cribado de ANA. Según las últimas recomendaciones internacionales [2], si se utilizan otros métodos alternativos se debe tener en cuenta la posibilidad de falsos negativos y positivos. En caso de elevada sospecha clínica, aunque el método alternativo sea negativo, se deberá realizar la IFI. En el informe de resultados se debe indicar el método utilizado. Los métodos basados en una mezcla de antígenos específicos no deberán nunca denominarse ANA Screen.

Las células HEp-2 representan un sustrato ideal para la identificación de ANA: células aisladas en monocapa, grandes núcleos y nucléolos, y todos los estadios del ciclo celular. Contienen más de 150 antígenos en su conformación nativa. El ICAP (International Consensus on ANA Patterns) describió 28 patrones de fluorescencia que se pueden visualizar en estas células [4]. Una de las novedades de esta clasificación es la inclusión del patrón granular fino denso (*dense fine speckled*) como un patrón con entidad propia (granulares y nivel competente). El autoantígeno es el factor de crecimiento derivado de epitelio de cristalino (LEDGE, 70 KDa), y la especificidad se denomina DFS70. Las conclusiones de la bibliografía más reciente indican que su identificación al microscopio es compleja (confirmación por métodos alternativos) y que su presencia aislada es muy baja en las enfermedades autoinmunes del tejido conectivo [5]. En el 4th International Consensus on ANA Patterns (ICAP) Workshop que tuvo

lugar en el reciente 13th Dresden Symposium on Autoantibodies (25-30 de septiembre 2017) se han incluido dos nuevos patrones (AC-0 y AC-29), por lo que en total son 29 patrones y el negativo [Figura 3]:

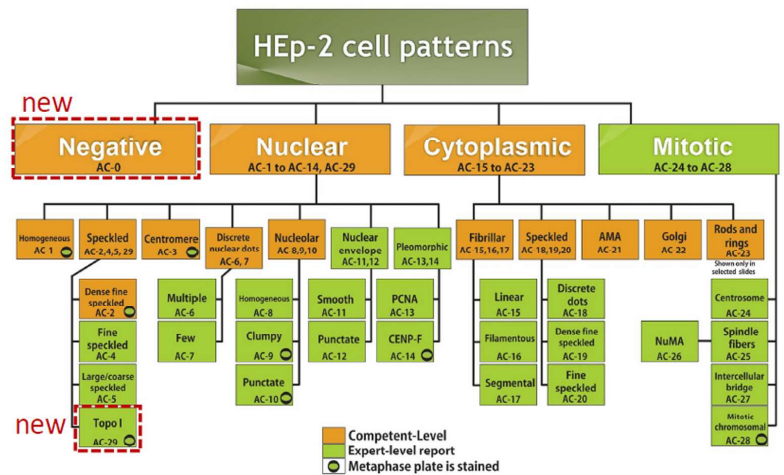


Figura 3. Patrones en HEp-2 según el IV Workshop del ICAP. Patrón negativo y patrones nucleares, citoplasmáticos y mitóticos en dos niveles (competente y experto) (Modificado de © 2015 Chan, E. K. L. et al. "Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015". *Front. Immunol* 6: Article 412; CC BY).

Sobre la nueva nomenclatura, han opinado 63 facultativos:

- El 46,03 %: no ha incorporado la nueva nomenclatura pero tiene intención de hacerlo
- El 23,81 %: está en proceso de cambiar a la nueva nomenclatura
- El 15,87 %: ya ha adoptado la nueva nomenclatura
- El 14,29 %: no tiene intención de cambiar a la nueva nomenclatura.

La IFI ofrece muchas ventajas (sensibilidad, reproducibilidad, fácil realización, económico) y algunas desventajas (estandarización, subjetividad, personal especializado). Respecto a la estandarización, los principales factores que influyen son la dilución de cribado (recomendado 1/160 o percentil 95 de la población) [2], el peticionario (especialidades o atención primaria), el fabricante de los portaobjetos (cultivo celular y fijación), el tipo de conjugado (se recomienda anti-IgG) [2] y el microscopio.

En referencia a la dilución de cribado utilizada, han opinado 67 facultativos:

- El 46,27 %: 1/80
- El 32,84 %: 1/160
- El 10,45 %: 1/40

- El 10,45 %: diferente según edad, peticionario, histórico, paciente nuevo o seguimiento, etc.

Respecto a la titulación, se han expresado 43 facultativos:

- El 60,47 %: diluye a ½ obviando diluciones.
- El 27,91 %: no titula.
- El 6,98 %: va diluyendo a ½ haciendo todas las diluciones.
- El 4,65 %: doble dilución de entrada.

Acerca del tipo de conjugado, hubo 47 opiniones:

- El 68,09 %: conjugado IgG específico del fragmento Fc de la cadena γ con Azul de Evans
- El 14,89 %: conjugado IgG específico del fragmento Fc de la cadena γ sin Azul de Evans
- El 8,51 %: conjugado trivalente IgG, A y M
- El 8,51 %: conjugado IgG H+L.

Cribado de ANA por inmunoensayo en fase sólida

Las principales causas de resultados discordantes entre diferentes ensayos son la composición antigénica (número y origen: purificados, recombinantes, sintéticos), el tipo de conjugado, el punto de corte (sensibilidad/especificidad) y la metodología. Respecto al punto de corte, cada facultativo lo debería redefinir en su laboratorio^[2].

Anticuerpos anti-antígenos nucleares extraíbles (ENA): cribado y caracterización

Se utilizan inmunoensayos en fase sólida y las causas de las discrepancias son las mismas ya comentadas para el cribado de ANA. Según las recomendaciones internacionales^[2], si el ANA es positivo se recomienda realizar anti-ENA. Si la sospecha clínica es alta, se puede solicitar su determinación aun siendo el ANA negativo en el caso de Jo-1, ribosomal y SS-A/Ro (especialmente si se ha realizado por IFI). Se recomienda determinar Ro60 y Ro52 por separado, pues es importante en la orientación diagnóstica^[2]. El informe de resultados debe indicar el método utilizado.

Respecto a la utilización de las diferentes metodologías, han opinado 46 facultativos:

- El 39,13%: cribado básico (6-7 antígenos) por ELISA/FEIA o CIA. Si es positivo, ENA específicos.
- El 28,26%: ENA específicos por ELISA/

FEIA, CIA o multiplex, en función del patrón.

- El 17,39%: cribado muy completo (>15 antígenos) por ELISA/FEIA o CLIA. Especificidades si es positivo.
- El 15,22 %: perfil de inmunoblot.

Anticuerpos anti-DNA de doble cadena (dsDNA)

Los anticuerpos anti-dsDNA forman parte de los criterios de clasificación del lupus eritematoso sistémico (LES)^[6]. Además son anticuerpos patogénicos y también resultan útiles en la monitorización de la actividad de la enfermedad^[7]. Los más importantes desde el punto de vista clínico son los anticuerpos de alta avidéz.

Para su detección se utilizan inmunoensayos en fase sólida y/o IFI en portaobjetos de *Crithidia luciliae* (CLIFT). El método de referencia es el ensayo Farr, prácticamente en desuso por ser RIA. En los inmunoensayos en fase sólida podemos tener dsDNA nativo, recombinante o sintético. Es fundamental que no haya contaminación por DNA de cadena simple y/o por histonas.

Aunque la mayoría de los métodos de inmunoensayo en fase sólida están calibrados frente al estándar internacional Wo/80, podemos encontrar discrepancias, debido a la presencia de dsDNA de distinto origen, con diferentes epítomos, anticuerpos de diferente avidéz, detección de diferentes repertorios de anticuerpos y diferentes conjugados. Esto da lugar a diferente sensibilidad y especificidad, distinto rango analítico de medida y linealidad, etc.

Según las recomendaciones internacionales^[2], si el ANA es positivo y se sospecha LES se debe hacer anti-dsDNA. La máxima especificidad la tendremos con *Crithidia* y Farr, por lo que se recomiendan como métodos confirmatorios de un ensayo previo más sensible. En el informe se deben indicar los resultados de ambos métodos por separado. Para la monitorización de la enfermedad se recomienda un ensayo cuantitativo.

Respecto a los 52 facultativos presentes en la sala, las preferencias fueron:

- El 46,15 %: inmunoensayo en fase sólida y confirmación de positivos con *Crithidia*
- El 21,15 %: inmunoensayo en fase sólida y *Crithidia* en paralelo
- El 17,31 %: *Crithidia*
- El 15,38 %: inmunoensayo en fase sólida.

Los anticuerpos anti-histonas y anti-nucleosoma son menos específicos de LES, apareciendo también en lupus inducido por fármacos, artritis reumatoide, vasculitis, hepatopatías y esclerodermia, y siendo útiles en pacientes con sospecha de LES seronegativos para anti-dsDNA.

Algoritmo de estudio de ANA, anti-ENA y anti-dsDNA

En la figura 4 se muestra un algoritmo general de estudio de ANA, ENA y dsDNA.

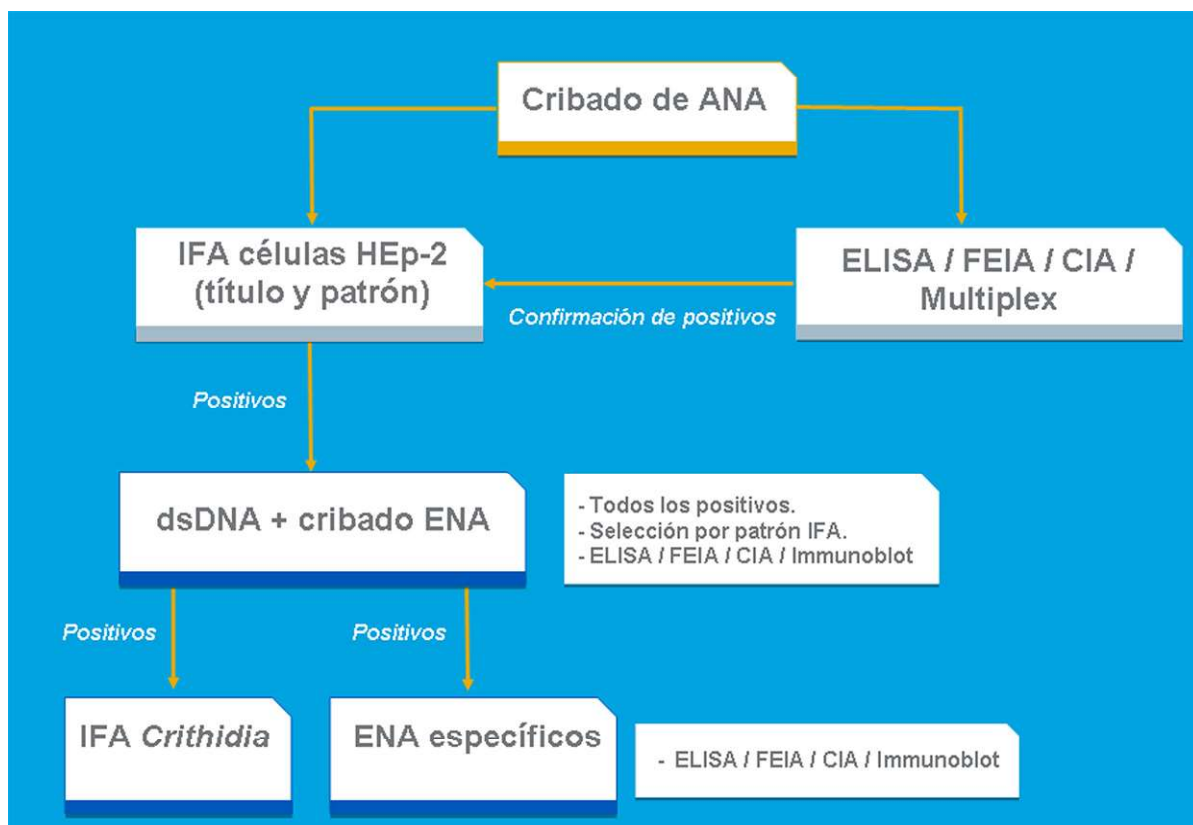


Figura 4. Algoritmo general de estudio de ANA, ENA y dsDNA (Figura elaborada por Susana López Sañudo e Irene Fernández Alonso; Werfen).

REFERENCIAS

- Mahler, M. et al. (2016). "Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies". *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **38**: 14-20.
- Agmon-Levin, N. et al. (2014). "International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies". *Ann. Rheum. Dis.* **73**: 17-23.
- Meroni, P. L. y Schur, P. H. (2010). "ANA screening: an old test with new recommendations". *Ann. Rheum. Dis.* **69**: 1420-1422.
- Chan, E. K. L. et al. (2015). "Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody HEp-2 cell patterns 2014-2015". *Front. Immunol* **6**: Article 412.
- López-Sañudo, S. et al. (2015). "Importance of the dense fine speckled pattern and anti-DFS70 antibodies for the diagnosis of systemic autoimmune rheumatic diseases". *Med. Clin.* **145**: 218-223.
- Petri, M. et al. (2012). Derivation and Validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis Rheum.* **64**: 2677-2686.
- Bentow, C. et al. (2016). "International multi-center evaluation of a novel chemiluminescence assay for the detection of anti-dsDNA antibodies". *Lupus* **25**: 864-872.