

Control de la Calidad en la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta, una materia pendiente

Dr. Orlando Gabriel Carballo
Bioquímico. Unidad Inmunología, Hospital Carlos G. Durand. Jefe del Área de Inmunología de MANLAB. Profesor adjunto del Departamento de Biología. Universidad Argentina John F. Kennedy. Certificado Especialista en Inmunología, categoría 1.

Los resultados de las pruebas serológicas para auto-anticuerpos, incluyendo la de anti-nucleares (ANA) y anticuerpos contra antígenos específicos como ser anti-DNA de doble cadena, son muy importantes en el diagnóstico de enfermedades reumáticas sistémicas. Muchas veces estos resultados pueden ser mal interpretados. Muy pocos de estos anticuerpos son patognomónicos para una enfermedad autoinmune reumática sistémica particular, como muchas veces los anticuerpos anti-virales sí lo son para enfermedades infecciosas. Por estas razones, el resultado de una prueba de ANA aislada, es insuficiente para establecer un diagnóstico. Resultados positivos son encontrados en pacientes sin patología reumática y aún en individuos jóvenes normales. Por lo tanto, muchas consideraciones técnicas son críticas para la correcta interpretación de los resultados, evitando así errores diagnósticos, terapias inapropiadas y un mal aprovechamiento de los recursos económicos en salud.

La primera prueba de laboratorio, descrita por Hargraves en 1948, que demuestra la presencia de anticuerpos anti-nucleares, es la prueba de las "Células LE". Este fue el primer soporte de laboratorio con que contó el médico para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES). Pero la escasa sensibilidad y especificidad de esta prueba llevó a los investigadores a intentar explicar este fenómeno, y guió a una serie de laboratorios al descubrimiento que el factor responsable del fenómeno de células LE era una familia de anticuerpos que reconocía diferentes constituyentes nucleares. Al final de la década del 50, fueron desarrolladas distintas pruebas utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y empleando como sustratos cortes criostáticos de tejidos (hígado y riñón) de roedores (rata o ratón). Comparado con la prueba de Células LE, la IFI se mostró mucho más sensible para el diagnóstico de LES. Sin embargo, esto fue acompañado con una disminución de la especificidad, y en un sustancial número de pacientes con otras enfermedades, aún en individuos sanos, se veía que la prueba de ANA

por IFI era positiva. En un esfuerzo por reducir el número de falsos positivos o resultados clínicamente irrelevantes, los laboratorios comenzaron a reportar los títulos, esto es: la máxima dilución del suero en la que persistía la coloración nuclear fluorescente (reacción positiva). En general, los pacientes con LES presentaban títulos mucho más altos que los individuos normales o con otras enfermedades. Aunque un gran número de pacientes presentaban una prueba de ANA positiva y no tenían LES, algunos pacientes con LES presentaban una prueba de ANA negativa. A pesar de estas limitaciones, una prueba de ANA positiva fue incorporada como uno de los criterios diagnósticos de LES por el Colegio Americano de Reumatología.

El análisis de los resultados de las pruebas de ANA sobre cortes criostáticos de tejidos revelaban diferentes patrones nucleares de coloración, por lo que los laboratorios comenzaron a informar los patrones observados, por ejemplo: **homogéneo, moteado, nucleolar o periférico**. En un primer momento se intentó relacionar el patrón con la clínica, sin embargo, la relevancia de estas asociaciones fueron ampliamente superadas por la capacidad de otras técnicas para categorizar los resultados positivos sobre la base de la especificidad antigénica del autoanticuerpo. Utilizando técnicas como la inmunodifusión, inmunoprecipitación, radioinmunoensayo, hemoaglutinación o enzimoimmunoensayo se puede demostrar la reactividad de los sueros ANA positivos contra diferentes antígenos nucleares tales como: anti-dsDNA, pequeñas ribonucleoproteínas nucleares como SSA/Ro, SSB/La, Sm, snRNP, enzimas tales como la Topo I (Sci-70) e histonas. La reactividad contra estos antígenos es más específica que los patrones y son de gran utilidad clínica.

Durante la década del 90, muchos laboratorios incorporaron la utilización de las líneas celulares como sustrato para la prueba de ANA, de éstas, la más comúnmente utilizada fue la HEP-2 proveniente de un carcinoma de laringe humano. Este sustrato ha reemplazado con considerables ventajas a los cortes criostáticos de tejidos de roedores y se ha convertido en el sustrato de referencia para esta determinación. Existen grandes diferencias entre estos dos sustratos. Primero, las células HEP-2 son más sensibles, virtualmente todos los pacientes con LES tienen una reacción positiva. Esto es consecuencia de que estas células presentan una composición antigénica distinta a los tejidos; por ejemplo, mayor concentración de antígeno SSA/Ro y de antígenos relacionados a la división celular como el Antígeno de



Proliferación Celular (PCNA). Por otro lado, como estas células están en división, muestran estructuras relacionadas al ciclo celular, como ser: centríolos, aparato mitótico, centrómeros y grandes nucleolos. Al mismo tiempo que se ha incrementado la sensibilidad se ha disminuido la especificidad, por lo que los laboratorios deben ajustar perfectamente sus condiciones de trabajo para interpretar los resultados correctamente, por ejemplo: buscando la dilución de corte que pueda discernir mejor entre los individuos sanos y los enfermos mejorando el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN).

Con la utilización de HEp-2 la cantidad de patrones observados se ha incrementado con los años hasta llegar, aproximadamente, a 50, teniendo en cuenta no sólo el teñido nuclear sino también el citoplasmático y de diferentes organelas como ser mitocondrias, Golgi, nucleolo y distintas estructuras del aparato mitótico tales como: uso mitótico, centríolos, etc. Por esta razón, y debido a que determinados antígenos, que en un primer momento podrían ser considerados nucleares, y que en realidad son de expresión citoplasmática (como por ejemplo el Jo-1 o el Ribosomal P), se propone el nombre genérico de **Anticuerpos Anti-nucleocitoplasmáticos (AAn)**. Esta interpretación requiere de profesionales muy entrenados en la interpretación de imágenes y con conocimientos de Biología Celular. Estos patrones nos permiten orientarnos en la especificidad antigénica del anticuerpo, para luego utilizar un método específico de identificación como ser ELISA, Western Blot, Inmunoensayo Lineal, Dot Blot, Hemoaglutinación, etc.

Garantía de la calidad y control de calidad

La actividad de garantizar la calidad en el laboratorio de análisis clínicos incluye prácticas y procedimientos utilizados para asegurar la calidad y reproducibilidad de los resultados. Muchos profesionales e instituciones están comprometidos en desarrollar sistemas de control de la calidad e informar aspectos referidos a la mejor interpretación de estas pruebas, sobre todo en situaciones clínicas donde los resultados son muy significativos.

Muchos esfuerzos se han hecho para ayudar a la correcta realización e interpretación de los resultados de estas prácticas. En nuestro país, en 1997 se ha desarrollado en Buenos Aires, organizado por la Unidad de Inmunología del Hospital Durand, el Primer Workshop y Conferencia Latinoamericana de Autoinmunidad con la presencia de importantes investigadores de todo el mundo: Dr. Eng Tan de Estados Unidos, Dr. Michel Kazatchkine y Dr. Patrice Debre de Francia, Dr. Luis Cohelo Andrade, Dr. Carlos von Muhlen de Brasil, Dr. Ignacio García De La Torre, Dr. Jorge Alcocer Varela y Dr Luis Llorente de Méjico, entre otros. En Brasil ya se han organizado dos reuniones de consenso de patrones de HEp-2 y desde el 2006, en nuestro país, se ha organizado, en la Fundación Bioquímica Argentina, dentro del Programa de Evaluación Externa de la Calidad, el Subprograma para Autoanticuerpos.

Existen numerosos trabajos que intentan solucionar diferentes problemas a la hora de estandarizar la técnica de IFI para AAn, como así también realizan recomendaciones para asegurar la calidad. De entre estos trabajos y guías se destaca la realizada por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) aprobada y publicada en 1996.

Consideraciones para asegurar la calidad de la determinación de AAn por IFI

Para la correcta interpretación de los resultados obtenidos por IFI para la investigación de AAn, es importante tener en cuenta el contexto en el cual se solicita la determinación. Un paradigma en autoinmunidad dice que: *"la presencia de un autoanticuerpo no implica la presencia de una enfermedad autoinmune"*, y en este sentido hay que tener en cuenta la diferencia entre autoinmunidad y enfermedad autoinmune. La autoinmunidad es un proceso normal y fisiológico del organismo, mientras que la enfermedad autoinmune es la manifestación no controlada de un proceso autoinmune que presenta una manifestación clínica. Por lo tanto, la solicitud de determinación de un autoanticuerpo debe estar realizada en el contexto clínico del paciente. Esto se ve agravado ya que, aún estableciendo correctos valores de corte para la determinación, se puede observar resultados positivos en un elevado porcentaje de individuos normales. Con el objeto de minimizar estos resultados, se debe tener en cuenta una serie de consideraciones que aseguren la calidad de nuestros resultados.

Consideraciones técnicas

- Microscopio
- Recolección y almacenado de las muestras
- Elección del sustrato
- Conjugado fluorescente y sueros de referencia
- Sueros de referencia
- Rango de referencia
- Nomenclatura e informes de resultados

Microscopio

Debido a la variedad de fuentes e intensidad de luz y filtros disponibles, la elección del microscopio es muy importante. Las lámparas pueden ser Halógenas o de Mercurio de distintas potencias (50 o 100 w).

La comparación de la intensidad de la fluorescencia requiere del uso de **estándares fluorescentes** que tengan el mismo espectro que el de los sustratos utilizados en los distintos estudios de inmunofluorescencia. Estos estándares fluorescentes son portaobjetos comerciales que contienen microesferas fluorescentes con distintas intensidades que permiten monitorear diariamente el comportamiento del microscopio. Permite chequear la sensibilidad de la lámpara controlando el desgaste de la misma, la uniformidad del campo de iluminación y la estabilidad de la fuente.

Recolección y almacenamiento de las muestras

La determinación debe hacerse en suero. La muestra puede ser refrigerada a 4°C si la determinación se realizara dentro de las 72 hs. Si la determinación se realizara después de las 72 hs, el material debe ser refrigerado a -20°C o menos. Sucesivas congelaciones y descongelaciones pueden alterar el resultado.

Elección del sustrato

Existen diversos sustratos y agentes fijadores, cada uno con diferentes grados de sensibilidad y especificidad. El sustrato más ampliamente recomendado es la HEP-2. Existen diversas marcas cada una con su manera particular de cultivo y método de fijación, los cuales permanecen como secretos industriales, debido a esto muchas veces resulta difícil comparar resultados entre laboratorios. Al no conocer el fijador utilizado y debido a que alguno de ellos, como ser etanol o metanol, no fijan antígenos como el SSA/Ro, es aconsejable agregar un control positivo para este anticuerpo.

Conjugado fluorescente y sueros de referencia

Habitualmente el anticuerpo anti-inmunoglobulinas humanas utilizado se marca con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Existen algunas consideraciones con respecto a la elección del conjugado, como ser: elección de la especificidad isotópica del conjugado, relación Fluoresceína/Proteína (F/P), relación anticuerpo específico / proteína (Ac esp/Pr) y dilución de trabajo.

- **Especificidad isotópica del conjugado:** En la determinación de AAn por IFI pueden ser usados tanto conjugados polivalentes (reactivos contra Ig G, Ig A e Ig M) como conjugados anti-Ig G específicas. El 96% de los pacientes con LES producen AAn de clase Ig G. Si se utiliza un conjugado Ig G específico no podrán ser detectados los AAn de clase Ig M asociados con la artritis reumatoidea, drogas o la edad. Sin embargo, un 4% de los pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas producen cantidades significativas de AAn Ig M específicas.

- **Relación F/P:** se recomienda que la relación F/P sea aproximadamente 3.0. Si la relación F/P es mayor, aumentará la tinción fluorescente no específica; por otro lado, si la relación F/P es menor disminuirá mucho la fluorescencia específica obteniendo resultados falsos negativos.

- **Relación Ac esp/Pr:** debe ser aproximadamente 0.1 o mayor dilución de trabajo del conjugado: el método más aceptado de titulación del conjugado es el de titulación en damero o tablero de ajedrez. Se debe contar con un suero de referencia o patrón primario o en su defecto un patrón secundario de título conocido, y de un suero negativo conocido. Se procede a realizar la

determinación a distintas diluciones del conjugado (por ejemplo 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800), diluyendo los controles positivos y negativos a partir de, por ejemplo, 1:40 y realizando diluciones sucesivas al medio hasta, por ejemplo, 1:2560. Suponiendo que el patrón primario tenga un título de 1:640, se obtendrían los resultados que figuran en el cuadro 1:

Conjugado	1:50		1:100		1:200		1:400		1:800	
	C+	C-	C+	C-	C+	C-	C+	C-	C+	C-
Control	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
1:40	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
1:80	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
1:160	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
1:320	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
1:640	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
1:1280	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1:2500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Cuadro 1

En el cuadro 1 se puede observar un ejemplo del comportamiento de la titulación. Se define "*Título plateau*", a la mayor dilución del patrón primario que es positivo en al menos tres diluciones diferentes y consecutivas del conjugado. Luego el título cae abruptamente. El último título positivo al nivel del plateau se lo denomina "*punto final del plateau*", en nuestro ejemplo 1:400. Usualmente, la dilución de trabajo del conjugado es un cuarto de la dilución del punto final del plateau, 1:100 en el ejemplo. En general, la dilución obtenida de esta manera y teniendo en cuenta la relación F/P y Ac. esp/Pr contiene aproximadamente entre 30 y 60 µg/mL.

La dilución óptima de trabajo del conjugado debe establecerse bajo las siguientes circunstancias:

- Cada vez que se use un nuevo lote de conjugado.
- Si se cambia el sustrato (incluso la marca del sustrato).
- Si se cambia el sistema óptico de lectura o al cambiar la lámpara.

Sueros de referencia:

En 1980, la Arthritis Foundation en colaboración con el Center for Disease Control (CDC) en Estados Unidos, establecieron un comité de anticuerpos anti-nucleares, con la función de producir y promover el uso de sueros de referencia. Fueron definidos según su especificidad y disponibles como patrones primarios. Otro control primario disponible es el producido por el National Institute for Biological Standards and Control, en colaboración con la Organización Mundial de la Salud. Este control tiene la particularidad de estar expresado en unidades, se define como la actividad presente en 0,186 mg de la preparación internacional de referencia y que corresponde a 100 UI. De esta manera, los laboratorios deberían transformar los resultados de títulos a unidades internacionales y así disminuiría la variabilidad interlaboratorial.

Rango de referencia

Se debe establecer el intervalo de referencia en pacientes normales según la edad, teniendo en cuenta el sexo. En el Laboratorio MANLAB procedimos a la determinación de AAn por IFI en 118 individuos considerados normales (dadores de sangre) separados según la edad, en



años, en 4 grupos (20-30, 31-40, 41-50, 51-60) y según el sexo, y 100 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, según los criterios del Colegio Americano de Reumatología. De este estudio surge que la dilución que presenta la mejor relación sensibilidad / especificidad es 1:160, obteniendo una sensibilidad del 95% y una especificidad del 92% para el LES, con un valor predictivo positivo (VPP) del 90% y un valor predictivo negativo (VPN) de 96%, siendo VPP la probabilidad de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo y el VPN la probabilidad de que un sujeto con un resultado negativo esté realmente sano. Como recomiendan los trabajos internacionales se considera como dilución de corte un título anterior, es decir 1:80 con el objeto de tener en cuenta a los pacientes lúpicos que presentan bajos títulos y recordando que la interpretación del resultado debe hacerse en un contexto clínico adecuado.

Nomenclatura e informes de resultados

Esta determinación debe ser considerada semicuantitativa, informando la dilución a punto final. De ser un resultado positivo se debe informar el título y el patrón fluorescente observado, nuclear homogéneo, granular, etc., incluyendo, de observarse, el patrón citoplasmático y el aparato mitótico. Si bien en nuestro país no hay consenso en este punto, en el Atlas – Anticuerpos anti-nucleocitoplasmáticos (HEp-2) proponemos junto a otros autores, basados en las reuniones de consenso brasilero de patrones de HEp-2, una clasificación de patrones y una sugerencia de informe.

Recomendaciones

Definición de resultado negativo: un resultado se considera negativo cuando no se discrimina un patrón fluorescente definido. Se debe tener en cuenta que la no determinación de anticuerpos en la prueba no implica ausencia de enfermedad. Esto puede deberse a la baja concentración de antígenos en el sustrato, como sucede con el antígeno SSA/Ro. Resultados negativos pueden observarse en pacientes con síndrome de Sjogren, polimiositis, artritis reumatoidea, esclerodermia y en un subgrupo de pacientes con LES considerados AAN negativos – SSA/Ro positivos con características clínicas particulares. Ante un resultado negativo, si aún existe una sospecha de una enfermedad autoinmune reumática sistémica hay que investigar la presencia de anti-SSA/Ro, anti-Ribosomal P y anti-Jo-1 por ELISA u otro método específico.

Definición de resultado positivo: un resultado debe ser considerado positivo cuando se observa una prueba reactiva por encima de la dilución de corte (cut off) donde se puede distinguir perfectamente un patrón fluorescente. Es muy importante recordar que un resultado positivo no implica enfermedad, pudiendo ocurrir en individuos adultos sanos como fue demostrado por Eng Tan y colaboradores publicado en 1997. Por lo

tanto, el resultado debe ser interpretado en el contexto clínico de cada paciente.

Por último hay que tener en cuenta:

- La edad y el género del paciente
- La ingesta de drogas que provoquen LES inducido, como por ejemplo: Hidralazina
- El título obtenido
- El patrón inmunofluorescente. Estos patrones pueden cambiar cuando se leen a diferentes diluciones. Debe ser reportada la presencia de más de un patrón con sus respectivos títulos.
- Tener en cuenta los criterios diagnósticos de enfermedades reumáticas sistémicas
- La posibilidad de la presencia de autoanticuerpos como fenómenos paraneoplásicos, como puede ocurrir en el cáncer de mama.
- La posibilidad de la presencia de enfermedades infecciosas, como por ejemplo suele ocurrir en la lepra o pacientes HIV positivos.

La naturaleza técnica de estas pruebas, la falta de estandarización, la dificultad en la obtención de patrones primarios, la observación subjetiva de los resultados, la utilización de diferentes microscopios, crean problemas singulares a la hora de establecer un programa de control de la calidad. Sólo una gran preocupación en la validez, exactitud y reproducibilidad de la técnica, usando sueros de referencia para la titulación del conjugado, estableciendo un control de calidad interno y participando en programas de control externo de la calidad, se conseguirán resultados más confiables y habrá mayor acuerdo entre los laboratorios. Esto será apreciado por médicos y redundará en el beneficio de los pacientes.

Bibliografía

- Journal of Clinical Microbiology. 1981;13:356-368.
Arthritis and Rheumatism. 1982;25:1003-1005
American Journal of Clinical Pathology. 1984;82:57-66
Clinical Chemistry. 1997;43:1987-1989.
Arthritis and Rheumatism. 1997;9:1601-1611
Arthritis and Rheumatism. 1997;40:410-412
Arthritis and Rheumatism. 1997;40:413-418
Clinical and Laboratory Immunology. 2000;7:72-78
Archives of Pathology and Laboratory Medicine. 2000;124:71-80.
Clinical Microbiology Newsletter. 2000;173-176
Inmunología. 2004;23:256-259
National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Guía I/LA2-A
Atlas of Immunofluorescent Autoantibodies. 1ra edición, 1996. Krapf, von Mühlen, Nakamura y col.
Atlas. Anticuerpos anti-Nucleocitoplasmáticos (HEp-2), 1ra edición, 2006. Carballo, von Mühlen, Nakamura y col.