



Panorama

¿Anticuerpos antinucleares o anticuerpos frente a ciertos antígenos nucleares?

Antinuclear antibodies or antibodies against certain nuclear antigens?

Marcos López Hoyos^{a,*}, Delia Almeida González^b, María Rosa Juliá Beníque^c, Álvaro Prada Iñurrategui^d y Belén Aparicio Hernández^e

^a Servicio Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, España

^b Unidad de Inmunología, Hospital Universitario Nuestra Señora de la Candelaria, Santa Cruz de Tenerife, España

^c Servicio Inmunología, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca, España

^d Servicio Inmunología, Hospital Universitario Donostia, San Sebastián, España

^e Servicio Bioquímica y Análisis Clínicos, Hospital Universitario Salamanca, Salamanca, España

Una de las pruebas clásicas disponibles en los laboratorios de diagnóstico de autoinmunidad es el estudio de anticuerpos antinucleares (ANA). Su uso se remonta a la descripción de las células LE por Hargraves en 1948, aunque su empleo era muy limitado debido, en gran medida, a la complejidad que presentaba la técnica. Al final de la década de los años cincuenta se empezó a aplicar la recién descrita inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como sustrato tejido de roedor. Después se introdujo el uso de células, habitualmente la línea HEp-2, cultivadas en monocapa y fijadas, que tenían la ventaja de disponer de un gran núcleo y presentar entre ellas varias en diferentes fases del ciclo de división celular, lo cual permitía detectar anticuerpos dirigidos frente a ciertos antígenos nucleares específicos de ciclo celular. Este importante cambio metodológico facilitó el estudio de los ANA en el laboratorio, convirtiéndose en un criterio diagnóstico para lupus eritematoso sistémico (LES)¹. A partir de este momento, el empleo de los ANA como prueba de diagnóstico se ha generalizado en la práctica clínica y no solo se considera un marcador de LES, sino que se utiliza como un parámetro inicial e inespecífico de cualquier tipo de enfermedad autoinmune, especialmente sistémica². Este cambio de concepto ha acarreado un

incremento de la demanda de la prueba por parte de los clínicos pudiendo afirmar hoy que por cada 20 peticiones de niveles de glucosa basal se solicita un estudio de ANA.

La diferencia sustancial entre la detección de ANA mediante IFI y la medición de los niveles de un analito como la glucosa es la estandarización y la automatización. La IFI exige un tratamiento de la muestra individualizado y visualización del resultado al microscopio por ojos expertos. Por el contrario, la cuantificación de la glucosa en sangre con un autoanalizador de una cadena analítica es prácticamente inmediata y no precisa una experiencia específica en el método o analito medido. Sin embargo, la presión asistencial es casi la misma y la inmediatez del resultado es exigida por igual. Por este motivo, en la última década, las empresas fabricantes de productos de diagnóstico in vitro autoinmune se han esforzado en desarrollar métodos de fase sólida (ELISA, multiplex, quimioluminiscencia, fluoroenzimoinmunoanálisis, etc.) que puedan detectar ANA en autoanalizadores en los que no sea fundamental la experiencia en la observación al microscopio y que informen los resultados en el día³⁻⁶.

La introducción de este tipo de métodos en el estudio inicial de los ANA produce un primer error conceptual y que debe ser

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mlopezhoyos@humv.es (M. López Hoyos).
0213-9626/\$ – see front matter © 2012 Sociedad Española de Inmunología. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.inmuno.2012.07.001>

tenido en cuenta tanto por el facultativo que realiza la prueba como por el clínico que la interpreta. Los análisis de fase sólida para la determinación de ANA en realidad no realizan un verdadero cribado de ANA. En estos ensayos suele haber extractos nucleares inmovilizados sobre el soporte sólido (placa de ELISA, micropartículas, etc.) y en esa extracción muchos de los autoantígenos nucleares con epítopos conformacionales se desnaturalizan y, a diferencia de lo que ocurre con la IFI sobre HEp-2, no son detectables. Por lo tanto, en esa sustitución tecnológica estamos perdiendo información y la sensibilidad de la prueba disminuye. Cuando además los reactivos empleados no utilizan un extracto nuclear sino un conjunto definido de antígenos purificados, nativos o recombinantes (8-12 asociados a las patologías autoinmunes más prevalentes), la diferencia con el pretendido cribado es todavía mayor. Estos métodos en ningún caso deberían ser tomados como pruebas de cribado de ANA sino que deberían ser considerados como lo que son, métodos de medición de unos determinados ANA⁷. Así, el Colegio Americano de Reumatología ha emitido un documento de posicionamiento en el que se precisa la obligatoriedad de realizar la técnica de IFI en el cribado de ANA.

La detección de ANA mediante IFI aporta 2 informaciones esenciales: el patrón de marcaje que se observa en las células incubadas con el suero a estudio y el título o dilución del suero más alta a la que se observa dicho patrón. La utilidad clínica de los ANA radica precisamente en esos patrones, de los que hay descritos más de 30, todos ellos con asociaciones clínicas. Obviamente, los más frecuentes son los mejor estudiados y los que tienen una relación clínica más clara. Así, por ejemplo, el patrón homogéneo se relaciona más con el LES, el moteado con el Síndrome de Sjögren y la enfermedad mixta del tejido conectivo, y el centromérico con el síndrome de CREST. Normalmente, esos patrones guardan una correspondencia con unas especificidades antigenicas concretas y que se han ido desvelando en las últimas décadas: DNA nativo, Ro/SS-A, La/SS-B, snRNP, Sm, etc. Si nos centramos en los patrones y especificidades mencionados, la correlación entre la técnica de IFI y los ensayos de fase sólida en cuestión es elevada, incluso con una mayor sensibilidad de los últimos, aunque a cambio de una pérdida de especificidad⁸. Habitualmente, los métodos que emplean antígenos recombinantes pueden dar resultados falsos positivos a títulos bajos en infecciones virales^{4-6,8}. Estos cambios de capacidad diagnóstica de los métodos muchas veces son desconocidos por los clínicos, que emplean los valores de sensibilidad y especificidad descritos en los libros clásicos y que normalmente se refieren al método de IFI. Por ello, es imprescindible conocer las características diagnósticas de la determinación de los ANA con la técnica empleada, consultando la información de validación interna que deben realizar los laboratorios clínicos antes de aceptar y adquirir un nuevo método diagnóstico. Además, no se debe olvidar que el estudio de ANA mediante IFI es una técnica de cribado donde interesa tener un elevado valor predictivo negativo y evitar los falsos negativos. Uno de los problemas de los ensayos de fase sólida para el estudio de ANA también radica en el elevado número de falsos negativos lo que disminuye el valor predictivo negativo.

Por otro lado, el estudio de ANA mediante IFI es capaz de detectar otros patrones de fluorescencia «esotéricos» o menos frecuentes con implicación clínica⁹. Esta es una ventaja

inherente de la técnica de inmunofluorescencia indirecta en la que puede encontrarse incluso aquello que no se está buscando. Hay que tener en consideración que el número de especificidades de ANA (alrededor de 80) es mucho mayor que el número de patrones (alrededor de 30) y normalmente no existen métodos disponibles para el estudio de esas especificidades en la rutina diaria del laboratorio. En cambio, la observación de un determinado marcaje en las células HEp-2 puede indicar la presencia de esos ANA y ayudar al diagnóstico de una enfermedad autoinmune sistémica¹⁰. Es más, se ha descrito la presencia de ANA, sin una especificidad determinada, en el suero de pacientes varios años antes de ser diagnosticados de una enfermedad autoinmune o incluso de debutar con los síntomas¹¹. Por ello, la presencia de ANA detectados mediante IFI puede servir de marcador precoz y predictivo de enfermedad autoinmune, especialmente cuando los títulos son elevados.

Uno de los argumentos esgrimido a favor de la introducción de los ensayos de fase sólida para la detección de los ANA es la mejora en términos de gestión y eficiencia, los cuales son especialmente sensibles en coyunturas económicas como la actual. Este argumento puede ser rebatido. En primer lugar, la técnica de IFI era considerada como manual y complicada pero hoy en día se ha conseguido la automatización gracias al empleo de preparadores de placas de IFI que realizan todos los pasos dejando los portaobjetos listos para colocar el cubre y proceder con la visualización al microscopio. Este último paso es el único que no se puede automatizar, que depende del experto en IFI, y que resulta decisivo para aportar una información completa en el estudio de ANA. Además, la técnica de montaje de la IFI se complementa con los software de gestión de los sueros y datos (habitualmente en sistemas de «middleware»), que conectan a los sistemas de información del laboratorio (LIS). Gracias a esta conexión, la preparación de las listas y diluciones de trabajo, así como la transmisión de resultados desde la misma lectura al microscopio, se realiza de forma casi inmediata desde la entrada de la muestra y volante de petición en el laboratorio. El empleo de los preparadores automáticos de portas y de un «middleware» que conecte con el LIS ha permitido en nuestro laboratorio que los resultados de ANA negativos estén disponibles en el HIS (sistema de información del hospital) en menos de 24 h. Avanzando aún más, uno de los «miedos ocultos» a la hora de emplear la IFI en el estudio de ANA es la dificultad en la interpretación de las imágenes al microscopio en grandes laboratorios de análisis generales, sin personal cualificado. Conscientes de este problema y de las limitaciones del empleo únicamente de los ensayos de fase sólida para el cribado de ANA, los fabricantes han dado un paso más y están actualmente desarrollando sistemas automáticos de lectura e interpretación de los portas de IFI¹². Estos sistemas habitualmente manejan un atlas con miles de imágenes, las cuales cruzan con las imágenes obtenidas en la IFI, y el programa sustituye el ojo humano para detectar la presencia de ANA. Esta aproximación es muy reciente y está en proceso de lanzamiento y mejora. En la actualidad, parece que funciona razonablemente bien con patrones muy claros y con títulos elevados de ANA, pero puede llegar a tener problemas con aquellos sueros con títulos débiles, patrones de IFI «esotéricos» o con problemas de la muestra (hemolizados,

lipídicos, etc.). No hay que olvidar que la mayor dificultad en la lectura de los resultados radica en la toma de decisión de clasificar a un suero como negativo, mucho más que en la identificación de un determinado patrón de marcaje específico¹³. Aún más tratándose de una prueba de cribado, en la que los resultados negativos son definitivos. Y en ese aspecto los sistemas de interpretación de resultados están aún en una etapa muy preliminar. En los próximos años seguramente asistiremos a avances significativos en esta área.

Por último, se debe tratar el aspecto económico. El coste de una prueba de ANA no es más barato cuando se realiza en fase sólida en un autoanalizador introducido en una cadena frente al ANA realizado mediante una técnica de IFI que emplea al menos 2 horas y que luego precisa de una lectura al microscopio. De hecho, el coste de los reactivos para la IFI es más barato y su encarecimiento viene derivado de la laboriosidad de la técnica, a pesar de la automatización descrita más arriba. El abaratamiento de la determinación de ANA no debe ser a costa del empleo de autoanalizadores que midan más analitos en un tiempo rápido, sino de la correcta indicación de la prueba de ANA^{14,15}.

Por ejemplo, en nuestro centro la frecuencia de estudios de ANA con resultado negativo era del 70-72% hace 10 años, mientras que en la actualidad ronda el 85%. La solicitud de la prueba se ha generalizado y su probabilidad pretest es muy baja, lo cual hace que aumenten los resultados negativos y la eficiencia de la petición de ANA caiga considerablemente. Como para cualquier prueba diagnóstica la probabilidad pretest de dicha prueba debe primar y no solicitarse porque es fácil «poner una cruz» o, actualmente, «dar un clic» en el gestor de peticiones. Además, se debe conocer bien el rendimiento de la prueba. El estudio repetido de ANA genérico cuando el paciente ya es conocido y diagnosticado y, por ejemplo, tiene anticuerpos anti-DNA nativo y anti-Ro, no aporta información clínica trascendente. En lugar de realizar todo lo que se puede solicitar en un gestor de peticiones, el laboratorio debe contar con reglas expertas que eviten la realización de pruebas redundantes o con poca utilidad clínica y que han consentido con los clínicos. Para ello, existen iniciativas lideradas por grupos de trabajo de sociedades científicas como el Grupo de Autoinmunidad de la Sociedad Española de Inmunología en las que se establecen guías clínicas y protocolos de diagnóstico basadas en la evidencia científica existente.

En resumen, para el estudio de ANA, el método de elección debe ser la IFI utilizando HEp-2 ya que, además de estar considerado «gold standard», presenta la mayor eficiencia. La actuación debe centrarse en la correcta petición de la prueba e interpretación de los resultados. Los ensayos de fase sólida tienen su utilidad como método de definición de especificidades de ANA una vez detectados mediante IFI y no deberían emplearse como cribado de ANA, sino como método de determinación de anticuerpos dirigidos frente a las especificidades de ANA más prevalentes.

BIBLIOGRAFÍA

- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982;25:1271-7.
- Wiik AS. Anti-nuclear autoantibodies: clinical utility for diagnosis, prognosis, monitoring, and planning of treatment strategy in systemic immunoinflammatory diseases. *Scand J Rheumatol.* 2005;34:260-8.
- Hanly JG, Thompson K, McCurdy G, Fougeres L, Theriault C, Wilton K. Measurement of autoantibodies using multiplex methodology in patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol Methods.* 2010;352:147-52.
- López-Hoyos M, Rodríguez-Valverde V, Martínez-Taboada V. Performance of antinuclear antibody connective tissue disease screen. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1109:322-9.
- Op De Beeck K, Vermeersch P, Verschueren P, Westhovens R, Mariën G, Blockmans D, et al. Detection of antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence and by solid phase assay. *Autoimmun Rev.* 2011;10:801-8.
- González C, Guevara P, Alarcón I, Hernando M, Navajo JA, González-Buitrago JM. Antinuclear antibodies (ANA) screening by enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant antigens: analytical and clinical evaluation. *Clin Biochem.* 2002;35:463-9.
- Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis.* 2010;69:1420-2.
- Sanz MT, Moga E, Gelpí C. Resultados del Taller de Autoinmunidad de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) 2010. *Inmunología.* 2011;30:54-67.
- Mahler M, Fritzler MJ. Epitope specificity and significance in systemic autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1183:267-87.
- Stinton LM, Fritzler MJ. A clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. *Autoimmun Rev.* 2007;7:77-84.
- Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2003;349:1526-33.
- Kivity S, Gilburd B, Agmon-Levin N, García Carrasco M, Tzafir Y, Sofer Y, et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clin Rheumatol.* 2012;31:503-9.
- Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum.* 1997;40:1601-11.
- Almeida González D, Cabrera de León A, Rodríguez Pérez Mdel C, Brito Díaz B, González Hernández A, García García D, et al. Efficiency of different strategies to detect autoantibodies to extractable nuclear antigens. *J Immunol Methods.* 2010;360:89-95.
- González DA, León AC, Varela AR, García MG, Rahola Mde S, Pérez Mdel C, et al. Autoantibody detection with indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: starting serum dilutions for systemic rheumatic diseases. *Immunol Lett.* 2011;140:30-5.