

Comparación entre quimioluminiscencia e inmunofluorescencia indirecta en la determinación de anticuerpos antinucleares

Palabras clave: Inmunofluorescencia indirecta, anticuerpos antinucleares, inmunoensayo, quimioluminiscencia.

Key words: Indirect immunofluorescence assay, antinuclear antibodies, immunoassay, chemiluminescence.

Recibido: 15/12/2009
Aceptado: 04/02/2010

María del Rocío Munive Lima,* Jesús I Simón Domínguez,*
Rodolfo González Solís,* María Eugenia Suárez Botello*

* Departamento de Laboratorio Clínico.
Centro Médico ABC Observatorio.

Correspondencia:
María del Rocío Munive Lima.
Centro Médico ABC, Departamento de Laboratorio Clínico
Sur 136 núm. 116, Col. Las Américas, 01120 México, D.F.
Tel: 52-30-8000 ext 8921. E-mail: marocili@yahoo.com.mx

100

Resumen

La determinación de anticuerpos antinucleares es una prueba de gran utilidad en el diagnóstico de diversas enfermedades del tejido conectivo. El método estándar para su determinación es la inmunofluorescencia indirecta, cuyas desventajas, como subjetividad y complejidad, han propiciado la generación de nuevos ensayos; uno de ellos es la quimioluminiscencia, siendo ésta una técnica automatizada de alta sensibilidad. El objetivo de este estudio fue evaluar la quimioluminiscencia y compararla con la inmunofluorescencia indirecta para la determinación de anticuerpos antinucleares. Se realizó un estudio descriptivo y transversal en el Centro Médico ABC de noviembre de 2006 a febrero de 2008. Se analizaron 208 muestras, obteniendo los siguientes resultados: 95% de sensibilidad, 59% de especificidad, valor predictivo positivo de 67% y valor predictivo negativo de 94%. Debido a su alta sensibilidad, la quimioluminiscencia es

Abstract

The detection of antinuclear antibodies is an important tool in the diagnosis of several connective tissue diseases. The standard method for its determination is the indirect immunofluorescence analysis, whose disadvantages like subjectivity and complexity have caused the generation of new tests; one of them is the chemiluminescent immunoassay, which is an automated technique with high sensitivity. The aim of the present work was to evaluate chemiluminescent immunoassay and compare them with indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. We did a descriptive and cross-sectional study in the ABC Medical Center, between november 2006 to february 2008. We analyzed 208 samples, obtaining the following results: 95% sensitivity, 59% specificity, 67% positive predictive value and 94% negative predictive value. Due to the high sensibility the chemiluminescent immunoassay is an attractive alternative

una alternativa atractiva como método de escrutinio de anticuerpos antinucleares; pero ante un resultado positivo, se recomienda confirmar los títulos y patrones, usando la inmunofluorescencia indirecta.

Introducción

La determinación de anticuerpos antinucleares (ANAs) es una prueba importante en la práctica reumatológica, ya que su identificación es de gran utilidad en el diagnóstico de diversas enfermedades del tejido conectivo (ETC).¹

La primera descripción de los anticuerpos antinucleares (ANAs) se realizó en 1948 y se les ha definido como un grupo heterogéneo de autoanticuerpos dirigidos contra antígenos localizados en el núcleo y citoplasma celulares.² Estos anticuerpos, en principio asociados a lupus eritematoso sistémico, se han identificado en otras enfermedades de tipo autoinmune y no autoinmune e incluso en sujetos sanos.²⁻⁴

Actualmente se cuenta con varias técnicas para detectarlos y caracterizarlos,⁵ siendo la inmunofluorescencia indirecta (IFI) el método estándar y de primera elección.^{2-3,6} La inmunofluorescencia indirecta es una técnica de alta sensibilidad que consiste en incubar el suero del paciente (anticuerpo) en un sustrato antigénico (células HEP-2, hígado o riñón de rata), al cual se le añade una antiinmunoglobulina unida a un fluorocromo que permite visualizar la reacción con un microscopio de fluorescencia. Los resultados son reportados como negativos o positivos, expresando la dilución y el tipo de patrón emitido.⁶

La gran desventaja de este método es que es operador-dependiente y la confiabilidad de los resultados está directamente relacionada con la experiencia del observador;⁷ éste y otros factores pueden llevar a falta de reproducibilidad, lo cual ya ha sido documentado por Tan y colaboradores quienes determinaron anticuerpos antinucleares con inmunofluorescencia indirecta en su-

as an screening method for antinuclear antibodies, whereas to the positive results it is recommended to confirm titles and patterns using indirect immunofluorescence.

jetos sanos, encontrándose coeficientes de variación interlaboratorios entre 36 y 51%.⁸

Debido a la baja reproducibilidad y los problemas asociados a su variabilidad, se han desarrollado métodos más simples y de alto rendimiento que pueden ser automatizados y estandarizados;² entre ellos, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), el cual fue introducido en 1972 para este fin y tiene como ventaja el ser una técnica objetiva, de fácil procesamiento, automatizada y menos operador-dependiente.⁹ Las desventajas del ensayo de ELISA con respecto a la inmunofluorescencia indirecta (IFI) son la falta de sensibilidad para antígenos citoplasmáticos o nucleares desconocidos y ausencia de un modelo de reactividad para anticuerpos antinucleares (ANAs) que existe en la IFI.

Actualmente existen diversos ELISA que se han propuesto como alternativa para el tamizaje de ANAs, los cuales difieren principalmente en su composición antigénica. Una alternativa que ha surgido para los métodos de IFI y ELISA es un inmunoensayo basado en el principio de quimioluminiscencia (CLIA), el cual está experimentando un creciente interés, ya que es un método simple, barato, que maneja coeficientes de variación de alrededor de 10%, presenta una sensibilidad y especificidad analíticas excelentes, además de que permite la resolución y cuantificación de varios analitos en mezclas relativamente complejas.¹⁰

Para la determinación de ANAs con CLIA, se emplea una fase sólida conformada por partículas magnéticas recubiertas con antígenos elevadamente purificados y recombinantes (dsDNA, RNP/Sm, SS-A (Ro), SS-B (La), Scl-70, Jo-1, CENP-B y mitocondria) junto con extractos nucleares de células HEP-2, y como conjugado anticuerpos mono-

clonales de ratón anti-IgG humano unidos a un derivado del isoluminol.¹¹ A través de incubaciones y procesos de lavado, los ANAs presentes en la muestra reaccionan con la fase sólida, el conjugado y reactivos, promoviendo una reacción de quimioluminiscencia, la cual genera una señal luminosa que es medida en un fotomultiplicador en unidades relativas de luz (RLU), que indican la concentración de ANAs en muestras de suero o plasma.¹¹

La CLIA posee todas las ventajas de un método de ELISA y como tal se está evaluando en la determinación de ANAs. El papel principal de los ELISA es funcionar como método de tamizaje antes de llegar a la IFI, ya que esto reduce de manera considerable el número de muestras analizadas por IFI que resultan negativas.

Debido a que la determinación de ANAs es una parte importante para el diagnóstico de varias enfermedades del tejido conectivo (ETC), es importante conocer si la determinación de ANAs mediante CLIA puede ser utilizado como método de tamizaje inicial antes de llegar a IFI sin pérdida de información crítica.

El objetivo de este estudio fue evaluar la determinación de ANAs mediante CLIA al compararla con la IFI utilizada como método estándar.

Material y métodos

Estudio descriptivo y transversal llevado a cabo de noviembre de 2006 a febrero de 2008, en el Laboratorio Clínico del Centro Médico ABC.

Se incluyeron los resultados de pacientes a los que se les realizó la determinación de anticuerpos antinucleares (ANAs) mediante ambas metodologías: inmunofluorescencia indirecta (IFI) y quimioluminiscencia (CLIA).

La determinación de ANAs mediante IFI se llevó a cabo en muestras de suero que se procesaron en el laboratorio de referencia Quest Diagnostics Inc (Nichols Institute, San Juan Capistrano, California, EUA), el cual emplea como sustrato antigénico células HEP-2.

La determinación de ANAs mediante CLIA se realizó en muestras de suero que se procesaron en el equipo LIAISON® ANA screen de DiaSorin, en el Laboratorio Clínico del Centro Médico ABC.

En casos específicos, se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes, mediante el empleo del expediente médico electrónico, orientado a la búsqueda de criterios diagnósticos de enfermedades del tejido conectivo (ETC).

Análisis. Los resultados obtenidos para ANAs mediante IFI se compararon contra los resultados obtenidos con CLIA.

Para elaborar una tabla de contingencia, las titulaciones con IFI menores de 1:40 se consideraron como negativas y las mayores o iguales a 1:40 como positivas.

Para los resultados obtenidos con CLIA se utilizaron los límites de referencia indicados por el proveedor, considerando como negativos los resultados menores de 1.5 RLU y positivos los mayores o iguales a 1.5 RLU.

Se calcularon los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos en base al teorema de Bayes.

Resultados

Durante el periodo de estudio se procesaron 208 muestras, el rango de edad de los pacientes estudiados fue 4 a 84 años, con predominio del sexo femenino (n= 187, 89.9%).

Los títulos por IFI de los 93 especímenes que resultaron positivos para ambos ensayos oscilan entre 1:40 a > 1:1,280, de los cuales seis tuvieron título de 1:40, dos de 1:80, 15 de 1:160, 16 de 1:320, 22 de 1:640, 17 de 1:1,280 y 15 con más de un patrón y título; los resultados obtenidos mediante CLIA en RLU se encontraron en el rango comprendido entre 1.86 y 12.

Los títulos de IFI de las cuatro muestras que no fueron detectados mediante CLIA mostraron lo siguiente: un título de 1:40 en paciente diagnosticada con lupus eritematoso sistémico bajo tratamiento

Cuadro I. Comparación de quimioluminiscencia (CLIA) con inmunofluorescencia indirecta (IFI) para la determinación de anticuerpos antinucleares (ANAs).

CLIA	IFI (Estándar)		Total
	Positivo	Negativo	
Positivo	93	45	138
Negativo	4	66	70
Total	97	111	208

médico desde hace seis años, una muestra con título 1:320 de paciente con siete resultados previos de ANAs positivos sin diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo (ETC), una muestra con título de 1:160 y otra con título 1:80 cuyos pacientes no regresaron a seguimiento; los resultados por CLIA en RLU de los cuatro fueron de 0.5.

Los valores de CLIA comparada con IFI se muestran en el *cuadro I* y son los siguientes: sensibilidad = 0.95, especificidad = 0.59, valor predictivo positivo = 0.67 y valor predictivo negativo = 0.94.

DISCUSIÓN

La determinación de anticuerpos antinucleares (ANAs) es una parte importante en la integración de un diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo (ETC); el método de escrutinio utilizado debe ser confiable para poder clasificar adecuadamente a los pacientes sanos y enfermos.

Por las desventajas encontradas en inmunofluorescencia indirecta (IFI) y por la gran cantidad de pruebas solicitadas, se han desarrollado nuevas técnicas que otorgan la posibilidad de automatización y objetividad, que pueden servir como método de escrutinio antes de la IFI, lo que disminuiría costos, tiempo de entrega y subjetividad en el procedimiento.

Dado que la prevalencia en la población de ANAs positivos es baja,⁴ el número de muestras con resultado negativo es elevado, lo que nos lleva a varias determinaciones de IFI negativas.

Recientemente, diversos estudios han tenido por objetivo el evaluar la utilidad de diferentes métodos de ELISA comparándolos con IFI, con la meta de disminuir el número de pruebas que son procesadas por IFI y así poder superar la variabilidad que presenta este método. Las conclusiones sobre los ELISA son discrepantes en términos de sensibilidad-especificidad entre diferentes reactivos comerciales. Estudios multicéntricos han reportado sensibilidades entre 69.5 y 97.7%, y especificidades entre 66.9 y 97.7%,¹¹ encontrando coeficientes de variación de 4 a 12%,^{2,7} que superan los coeficientes de variación reportados por IFI entre 36 y 51%; el coeficiente de variación encontrado para CLIA en nuestro estudio fue de 11%.

Como hallazgo incidental, se encontró que en los resultados en donde se obtuvo concordancia por ambas metodologías, CLIA presentó como valor mínimo 1.86 de RLU, el cual no puede ser considerado como punto de corte para esta metodología; éste tendría que ser confirmado mediante una validación clínica con sujetos sanos y con pacientes con diagnóstico de enfermedades autoinmunes, para determinar el valor ideal que optimice la sensibilidad y especificidad de esta metodología.

En un estudio previo realizado por Ghilliani y colaboradores¹¹ se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad de 94 y 99.3% para CLIA; dichos resultados no son comparables con los obtenidos en el presente estudio, por las diferencias en el diseño y en el punto de corte, ya que en ese caso se consideraron como positivos títulos mayores o iguales a 1:160 por IFI.

Conclusiones

Basados en el resultado del valor predictivo positivo para CLIA, proponemos el uso de esta metodología como prueba de tamizaje antes de llegar a IFI; usado de esta manera un resultado negativo puede ser reportado como tal, mientras que un resultado positivo siempre debe ser confirmado por IFI, esto

ayudará a racionalizar los recursos y disminuir el número de muestras que son procesadas con IFI.

Referencias

1. Hoffman IE, Peene I, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening test. *Clin Chem* 2002; 48 (12): 2171-2176.
2. Fenger M, Wiik A, Hoier-Madsen M, Lykkegaard JJ, Rozenfeld T et al. Detection of antinuclear antibodies by solid-phase immunoassays and immunofluorescence analysis. *Clin Chem* 2004; 50 (11): 2141-2147.
3. Ulvestad E, Kanestrom A, Madland TM, Thomassen E, Haga HJ et al. Evaluation of diagnostic test for antinuclear antibodies in rheumatological practice. *Scand J Immunol* 2000; 52: 309-315.
4. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody test in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117 (2): 316-324.
5. Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH. Evidence-Based guidelines for the use of immunologic test: Antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002; 47 (4): 434-444.
6. Gniewek RA, Stites DP, McHugh MT, Hilton JF, Nakagawa M. Comparison of antinuclear antibody testing methods: Immunofluorescence assay versus enzyme immunoassay. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4 (2): 185-188.
7. Hayashi N, Kawamoto T, Mukai M, Morinobu A, Koshiba M et al. Detection of antinuclear antibodies by use of an enzyme immunoassay with nuclear HEP-2 cell extract and recombinant antigens: Comparison with immunofluorescence assay in 307 patients. *Clin Chem* 2001; 47 (9): 1649-1659.
8. Tan EM, Smolen JS, McDougal JS, Butcher BT, Conn D et al. A critical evaluation of enzyme immunoassays for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. *Arthritis Rheumatism* 1999; 42 (3): 455-464.
9. Kern P, Kron M, Hiesche K. Measurement of antinuclear antibodies: Assessment of different test systems. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7 (1): 72-78.
10. García-Campaña AM, Baeyens WRG, Zhang X, Alés F, Gámiz L. Quimioluminiscencia: Una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. *Ars Pharmaceutica* 2001; 42 (1): 81-107.
11. Ghillani P, Rouquette AM, Desgruelles C, Hauguel N, Le Pendeven et al. Evaluation of the LIAISON ANA screen assay for antinuclear antibody testing in autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109: 407-413.