

**CONCORDANCIA Y EXACTITUD DIAGNÓSTICA ENTRE
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA Y ENZIMOINMUNOENSAYO PARA EL
CRIBADO DE ANTICUERPOS ANTI-NUCLEARES**

Pedano, Valeria
Pascual, Clarisa
Silvera, Élida
Vaca, Alejandra

Laboratorio Sección Inmunología - Hospital San Roque - Córdoba - Argentina

Correspondencia: Pascual Clarisa Natalí. Laboratorio Sección de Inmunología,
Hospital San Roque. Bajada Pucará 1900 – Córdoba - Argentina
E-MAIL: Clarisa.np@gmail.com - TE: 03541-15625788

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando células HEp-2 como sustrato, es considerado el método “*gold standard*” para la investigación de anticuerpos anti-nucleares (ANA). Existen en la actualidad ensayos basados en inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), para la detección de ANA. **OBJETIVO:** comparar las técnicas de IFI y ELISA (ANA *screening*), utilizadas en la detección de los ANA, calcular el índice *kappa* de concordancia y la sensibilidad y especificidad del método de ELISA con respecto a la IFI. **MATERIALES Y MÉTODOS:** se utilizaron resultados de pacientes que acudieron al Laboratorio del Hospital San Roque, con pedido de ANA por sospecha de alguna enfermedad reumática autoinmune sistémica (ERAS), los cuales fueron analizados por los métodos de IFI, con improntas de células HEp-2000 (IMMUNOCONCEPT) y ELISA (ANA *screening*; BioSystems) paralelamente; se calcularon los distintos parámetros estadísticos con los datos recolectados en forma retrospectiva. **RESULTADOS:** de un total de 107 muestras, 61 concordaron en la positividad de los ensayos de IFI y ELISA, y 40 arrojaron resultados negativos por ambas técnicas. De 65 muestras con ANA positivos por IFI, 4 resultaron negativos por ELISA, mientras que de 42 muestras con ANA negativos por IFI, 2 fueron positivas por ELISA. La sensibilidad y la especificidad del ELISA resultaron en un 93,85% (IC 95%= 84,97%-98,26%) y 95,24% (IC 95%= 83,80%-99,28%) respectivamente y el índice *kappa*= 0,883. **CONCLUSIÓN:** se pudo evidenciar que la técnica estudiada de ELISA, denominada ANA *screening*, tiene una aceptable concordancia con la IFI en la detección de los ANA. Los valores de sensibilidad y especificidad en relación a la IFI son admisibles (> 90%).

Palabras clave: anticuerpos anti-nucleares, inmunofluorescencia indirecta, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son un grupo heterogéneo de auto-anticuerpos que se pueden detectar en sueros de sujetos con enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas (ERAS), como lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren (SSj), esclerosis sistémica (ES), artritis reumatoide (AR), miopatías inflamatorias idiopáticas (MII) y vasculitis sistémicas (VS). Los auto-anticuerpos son muy útiles en el diagnóstico, evaluación del pronóstico y monitorización de la evolución clínica de los pacientes con ERAS (1).

En los últimos años, varios estudios han revelado la importancia de la detección temprana de los auto-anticuerpos como predictores de enfermedad en patologías autoinmunes, fundamentales para la prevención de estas enfermedades y atenuación del impacto clínico (2).

El diagnóstico temprano y preciso de ERAS puede ser muy difícil porque el espectro de signos y síntomas es muy amplio y a menudo se superponen. Después de que se confirma la presencia de una ERAS, teniendo en cuenta criterios diagnósticos, clínicos y de laboratorio, deben diferenciarse las patologías entre sí. Esto puede complicarse aún más por la evolución de las ERAS de una afección a otra. La interpretación adecuada de un ANA positivo o negativo puede ayudar a aclarar la precisión diagnóstica y pronóstica de la enfermedad (3).

Por la elevada sensibilidad diagnóstica, la inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando células HEp-2, (*human epidermoid carcinoma strain #2*), como sustrato, es considerado el método "gold standard" para la investigación de ANA. Sin embargo, resultados positivos de la prueba, pueden ocurrir también, en el contexto de enfermedades infecciosas, neoplásicas o incluso en individuos saludables (4).

La técnica de IFI, permite la detección de una gran cantidad de antígenos nucleares y de citoplasma (5). Sin embargo, el ensayo presenta algunas desventajas; es laborioso, debido a la gran cantidad de diluciones en serie, además de la determinación visual de los patrones de tinción, para lo cual se requiere de personal entrenado. El ensayo es subjetivo ya que depende en gran medida de la interpretación del observador. La heterogeneidad en las distintas marcas y tipos de lámparas de microscopios utilizados, la potencia de la luz, aumento de lente y sustratos HEp-2, contribuyen sustancialmente a su variabilidad; otra limitación es la baja especificidad de la prueba (2).

En muchos laboratorios de inmunología, se ha comenzado a trabajar con técnicas alternativas a la IFI, desde el desarrollo de ensayos de ANA basados en ELISA, (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), técnicas multiplex automatizadas de alto rendimiento y hasta tecnologías de matriz para la detección de ANA (3). El método de ELISA ofrece una aceptable sensibilidad, alto rendimiento y relativo bajo costo (6). Pero, debido a una prevalencia significativa de resultados ANA "falsos positivos" utilizando estos nuevos métodos, ha habido una preocupación creciente sobre la adopción unilateral de estos ensayos de cribado y alto rendimiento (3). Desafortunadamente, se ha hecho poco para estandarizar estas técnicas, y la vigilancia posterior a la comercialización y garantía de calidad se dejan, en gran parte, en mano de los fabricantes (6).

En la actualidad los datos publicados sobre el desempeño del ensayo de ELISA para la detección de ANA son escasos, y no corresponden a estudios de nuestro país, por lo tanto, es necesario que cada laboratorio evalúe esta técnica antes de ponerla en marcha (7-10).

Sería de importancia, la verificación de equipos que utilicen la técnica de ELISA, disponibles comercialmente en la actualidad, para evaluar la posibilidad de implementarlos en los laboratorios, como un método de cribado para los ANA.

Si bien estos ensayos por ELISA no constituyen una técnica “*gold standard*” para la detección de ANA, se podrían utilizar como prueba alternativa, teniendo en cuenta que la técnica de IFI es operador dependiente, requiere de un microscopio de fluorescencia, y personal altamente entrenado para realizarla. Por lo antes mencionado, es necesario estudiar sensibilidad y especificidad diagnóstica del ELISA (*ANA Screening*) y realizar ensayos de comparación que evalúen la concordancia del método, con respecto al de referencia (IFI), para poder incorporarlo como posible técnica de pesquisa de los ANA, en caso de no contar con la posibilidad de realizar técnicas de IFI.

OBJETIVOS

Principal

- Comparar las técnicas de IFI y ELISA, utilizadas en la detección de los ANA.

Secundario

- Realizar el cálculo de concordancia entre ambos métodos, y evaluar exactitud diagnóstica del ELISA respecto a la IFI mediante el cálculo del par sensibilidad-especificidad.
- Evaluar la posible incorporación de un ensayo alternativo a la IFI en el cribado de los ANA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio: se realizó un estudio observacional, analítico, transversal y retrospectivo.

Lugar de realización: Laboratorio de Inmunología, del Hospital San Roque de la ciudad de Córdoba.

Muestras y sujetos en estudio: se recolectaron datos del archivo informático del Laboratorio de Inmunología del Hospital San Roque correspondientes al periodo marzo-diciembre del año 2017. Se analizaron los resultados de la determinación de ANA realizada paralelamente por los métodos de IFI y ELISA, de 107 muestras de suero de pacientes que concurren al laboratorio.

Criterios de inclusión: se incluyeron pacientes adultos de ambos sexos mayores de 18 años y menores de 75 años, a los cuales se les solicitó la determinación de ANA por sospecha de ERAS.

Criterios de exclusión: se excluyeron pacientes con datos incompletos del archivo informático.

Métodos: las muestras de los pacientes seleccionados fueron analizadas para ANA por las dos metodologías; IFI sobre impresas de células HEP-2000 (INMUNOCONCEPT) y por un ELISA comercial (*ANA-Screening*, BioSystem). Cabe destacar que se utilizó la misma marca de reactivos en todas las determinaciones.

Ensayo de Inmunofluorescencia indirecta (IFI): la IFI se realizó en improntas de células HEp-2000 (línea celular modificada genéticamente para aumentar la sensibilidad a los auto-anticuerpos SS-A/Ro sin afectar los otros patrones ANA observados), utilizando un título de corte de 1:80; se usó buffer fosfato salino (PBS), para realizar las diluciones de las muestras y los lavados, y un conjugado de antigamaglobulina anti-IgG marcada con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Biocientífica, España), diluido 1:800. La observación se realizó en un microscopio de fluorescencia de lámpara LED marca BioSystems.

Ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzima (ELISA): se realizó la determinación de los ANA con un ELISA basado en antígenos nucleares adsorbidos a la superficie de los pocillos de una microplaca. Se siguieron las instrucciones dadas por el fabricante en el inserto del equipo. La microplaca está formada por 12 módulos de 8 pocillos cada uno, "sensibilizados" con una mezcla de antígenos SSA 52, SSA 60, SSB, Sm/RNP, RNP-70, RNP-A, RNP-C, SmBB, SmD, SmE, SmF, SmG, Scl-70, Jo-1, dsDNA, ssDNA, polinucleosomas, mononucleosomas, histonaH1, histona H2A, histona H2B, histona H3, histona H4, PMscl-100 y centrómero B. Se incubaron las muestras diluidas de los pacientes, control positivo (+), control negativo (-), y patrón de valor discriminante (CO), en los distintos pocillos. A continuación, se incubó con anticuerpos anti-IgG humana conjugados con peroxidasa. Finalmente, se añadió el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina) en presencia de H₂O₂, que al ser degradado por la peroxidasa da lugar a un producto color azul. Luego, la reacción enzimática se frenó con una solución de ácido sulfúrico y el color amarillo del producto final de la reacción se midió a 450 nm de longitud de onda, en un lector de ELISA. La concentración de anticuerpos en la muestra es proporcional a la absorbancia del producto de la reacción. Se calculó la razón de absorbancia aplicando la siguiente fórmula:

Razón de absorbancia = $A_{450nm} \text{ MUESTRA} / A_{450nm} \text{ CO}$

Se consideraron positivas, las muestras con razón de absorbancia superior a 1,2

Se consideraron negativas, las muestras con razón de absorbancia inferior a 1,0

Las muestras con razones comprendidas entre 1,0 y 1,2, fueron consideradas dudosas.

Análisis estadístico: el análisis de los datos se realizó con el programa informático MedCalc versión demo. Para establecer la concordancia entre los métodos se empleó el índice de concordancia *kappa* (k), se consideró un índice de concordancia aceptable $k \geq 0,8$. Para evaluar la exactitud diagnóstica del ELISA se calculó sensibilidad y especificidad; los valores de ambos estadísticos se expresan junto a sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC 95%).

RESULTADOS

La sensibilidad calculada del ELISA ANA *Screening* fue de 93,85% (IC 95% = 84,97% - 98,26%) y la especificidad de 95,24% (IC 95% = 83,80% - 99,28%). El índice *kappa* calculado fue $k = 0,883$.

De un total de 107 muestras, 61 muestras ANA positivas por ELISA concordaron con la positividad por IFI, y 40 muestras ANA negativas por ELISA concordaron con IFI negativa.

Hubo un total de 6 resultados discordantes entre ambas técnicas: 4 negativos por ELISA, que mostraron fluorescencia positiva, (patrón citoplasmático y patrón nucleolar) y 2 positivos por ELISA, que dieron fluorescencia negativa.

En la tabla 1 se muestran los resultados positivos y negativos obtenidos con ambas técnicas, en el total de las muestras analizadas. Se indican también los valores de los parámetros analíticos calculados.

Tabla 1: comparación de resultados de ANA por los métodos de IFI (“gold standard”) y ELISA.

	ANA IFI (+)	ANA IFI (-)	TOTAL
ANA ELISA (+)	61	2	63 (58,9%)
ANA ELISA (-)	4	40	44 (41,1%)
TOTAL	65 (60,7%)	42 (39,3%)	107

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el elevado costo del ensayo, y la necesidad de contar con profesionales altamente capacitados en la visualización de los distintos patrones de IFI, es que surge la idea de evaluar un ensayo de ELISA, de implementación más sencilla en el laboratorio de inmunología, e incluso con potencial de automatización, en casos de procesar un alto número de muestras.

La detección de ANA es parte de los criterios diagnósticos de las ERAS y puede ser importante también a los fines de monitoreo (11). El método estándar de oro para la detección de ANA sigue siendo la IFI en células epiteliales humanas (HEp-2), ya que las pruebas alternativas existentes no muestran una sensibilidad comparable (12).

Durante la última década, se han utilizado diferentes estrategias para desarrollar, evaluar y comercializar ensayos de ELISA para la detección de ANA (13). Comparando con la IFI, la técnica de ELISA es objetiva, requiere un operador menos entrenado y tiene potencial para la automatización (14). La mayoría de los ELISA de cribado de ANA utilizan mezclas de antígenos nucleares purificados de fuentes nativas y/o tecnologías recombinantes. La composición de estas preparaciones de antígenos es bastante diversa (14). Por lo tanto, es aconsejable una evaluación cuidadosa de los diversos equipos disponibles en el mercado antes de incluir cualquiera de estos métodos en las pruebas clínicas y de diagnóstico.

En el presente estudio, el ensayo de ELISA tuvo un alto porcentaje de pruebas positivas, en concordancia con la positividad para esas muestras en la IFI, lo mismo ocurrió con los ANA negativos, que concordaron para ambos ensayos, además se observó un bajo porcentaje de resultados positivos y negativos que no se correspondieron en ambas técnicas.

El rendimiento de los ensayos podría variar mediante la manipulación de los límites de corte, no obstante, se debe tener en claro que las técnicas pueden detectar solo anticuerpos para los antígenos que están presentes en la microplaca del ELISA y

ningún cambio en los puntos de corte puede modificar esto, a fines de mejorar el rendimiento del método.

En casos particulares, el ELISA arrojó resultados negativos, con positividad para IFI, (falsos negativos). En cuanto a estas discrepancias, se podría explicar la situación por la falta de detección de auto anticuerpos frente a antígenos nucleares y/o citoplasmáticos que solo pueden identificarse mediante IFI debido a su compartimentalización celular y a una mayor densidad de antígenos localizados en células HEP-2000, que no están incluidos en su totalidad en el diseño del ELISA evaluado. Sin embargo, hay alternativas para la mejora de las pruebas de ELISA disponibles, que podrían incluir la adición de nuevos antígenos purificados o recombinantes en los ensayos (13). Particularmente, las muestras que por IFI fueron ANA positivos, y resultaron negativos por ELISA, mostraron un patrón nucleolar y citoplasmático, interpretando esto, como resultado de la ausencia de ciertos antígenos puntuales del citoplasma y/o nucléolos, en las placas del ELISA ensayado, por lo que no se pueden detectar los anticuerpos por esta técnica. Estudios recientes demuestran que se debe prestar atención al hecho de que para ciertos diagnósticos de enfermedades reumáticas, se ha demostrado que las pruebas de ELISA no pueden revelar la presencia de ciertos ANA relacionados con la enfermedad. Se encuentran deficiencias similares en la detección por ELISA en casos IFI positivos de pacientes con polimiositis y dermatomiositis, debido a que el ELISA contiene principalmente antígenos nucleares y es capaz de detectar solo anticuerpos contra el antígeno citoplásmico Jo1 (13). Por otro lado, la razón de los falsos positivos en el ensayo podría ser la elección del punto corte. Al aumentar el valor de corte, la tasa de falsos positivos podría disminuir, aunque influir a su vez ligeramente en la sensibilidad del ensayo.

Los valores de sensibilidad y especificidad que se obtuvieron para ELISA ANA *Screening* son sólo algo inferiores a los reportados por el fabricante (98,9% de sensibilidad y 97,9% de especificidad), por lo que se considera que sería un buen ensayo para implementar en la rutina diaria. Por otra parte, la concordancia entre ambos métodos es aceptable, ($k= 0,883$).

Se ha evidenciado, en estudios previos, que la asociación de los ensayos de cribado en fase sólida con la IFI aumenta la sensibilidad del 89,2% al 97,4% y la especificidad del 64,6% al 98,4% en las pruebas serológicas para el cribado de ANA. El ensayo de ELISA sería un buen método, porque detectaría ANA positivos que luego se confirmarían con otras técnicas más específicas, y minimizaría la población ANA negativo. Un análisis de costos demostró que la combinación de las dos técnicas representa una vía de diagnóstico rentable, disminuyendo los costos globales para el diagnóstico inmunoserológico de trastornos autoinmunes relacionados con ANA (11). La elección de la prueba dependerá no sólo del rendimiento técnico de la misma, sino también de los costos, la accesibilidad y las metas generales en la realización de las pruebas de ANA.

Los resultados muestran que la concordancia entre ambos métodos es buena, por lo que ELISA ANA *Screening* podría reemplazar a la IFI para la detección de los autoanticuerpos, idealmente las pruebas positivas deberían confirmarse e investigarse adicionalmente, ya sea, como patrones detectados en IFI o mediante el uso de los ELISA disponibles para la prueba de anticuerpos específicos (13). Sin embargo, más allá de la importancia de estudiar la especificidad de los ANA positivos, para poder ayudar al diagnóstico de una enfermedad autoinmune en particular, cabe señalar la

importancia de contar con una técnica de tamizaje de ANA, con parámetros analíticos altos de sensibilidad/especificidad y una buena concordancia con respecto al método de referencia. Esto sería una herramienta de gran utilidad en laboratorios que no cuentan con técnicas más complejas y costosas como la IFI, para poder utilizar en reemplazo de la misma, obteniendo resultados confiables y de calidad.

CONCLUSIÓN

Evidenciamos en este estudio, que ELISA ANA *Screening* tiene una buena concordancia con la IFI en la detección de los ANA. Tanto sensibilidad como especificidad, fueron superiores al 90%. Por lo tanto, se considera que ELISA ANA *Screening* sería un buen método en el cribado de ANA; los resultados positivos se confirmarían con técnicas más específicas. Si bien los resultados son alentadores, el número de casos estudiado es pequeño, por lo que sería interesante comparar estas metodologías en una población mayor, ya que parecería ser un buen método a considerar, para implementarlo como técnica alternativa en la pesquisa de los ANA.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Pérez Dolores, Gilburd Boris, Cabrera-Marante Óscar, A. Martínez-Flores José, Serrano Manuel. Predictive autoimmunity using autoantibodies: screening for anti-nuclear antibodies. *Clin Chem Lab Med* 2017;1-2.
- 2) Zafer Mengeloglu, TekinTas, Esra Kocoglu, Gülali Aktas, Seyda Karabörk. Determination of anti-nuclear antibody pattern distribution and clinical relationship. *Pak J Med Sci* 2014; 30(2):381-382.
- 3) Mahler Michael, Meroni Pier-Luigi, Bossuyt Xavier, and J. Fritzler Marvin. Current Concepts and Future Directions for the Assessment of Autoantibodies to Cellular Antigens Referred to as Anti-Nuclear Antibodies. *J Immunol Res.* 2014, Article ID 315179:6-12.
- 4) Brito Fabiano de Almeida, Santos Silvana Maria Elói, Ferreira Gilda Aparecida, Pedrosa William, GradisseJanaina, Costa Lara Cristina, Figueiredo Neves Suzane Pretti. Detecção de anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta em células HEp-2: definindo a diluição de triagem adequada para o diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes. *Rev Bras Reumatol.* 2013;54(1):13–20.
- 5) Scholz Juliane, Grossmann Kai, Knütter Ilka, Hiemann Rico, Sowa Mandy, Nadja Röber. Second generation analysis of antinuclear antibody (ANA) by combination of screening and confirmatory testing. *Clin Chem Lab Med* 2015; 53(12): 1991–2002.
- 6) Tan E, Smolen J, Steven Mc Dougal J. et.al. A critical evaluation of enzyme immunoassay kits for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. *J Rheumatol* January 2002;29(1):68-74.
- 7) Solomon Daniel H., Kavanaugh Arthur J, Schur Peter H., and the American College of Rheumatology ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines. Evidence-Based Guidelines for the Use of Immunologic Tests: Antinuclear Antibody Testing. *Arthritis Rheum.* 2002;47(4):434-444.
- 8) Sinclair D1, Saas M, Williams D, Hart M, Goswami R. Can an ELISA replace immunofluorescence for the detection of anti-nuclear antibodies?--The routine use of anti-nuclear antibody screening ELISAs. *Clin Lab* 2007;53(3-4):183-91.
- 9) Tonuttia E1, Bassetti D, Piazza A, Visentini D, Poletto M, Bassetto F, Caciagli P, Villalta D, Tozzoli R, Bizzaro N. Diagnostic accuracy of ELISA methods as an alternative screening test to indirect immunofluorescence for the detection of antinuclear antibodies. Evaluation of five commercial kits. *Autoimmunity.* 2004; 37(2):171-176.
- 10) Michael O'Sullivan Andrew McLean-Tooke Richard Loh. Antinuclear antibody test. Antinuclear antibody test. *CLINICAL.* October 2013; 42 (10):718-721.
- 11) Pier Luigi Meroni, Nicola Bizzaro, Ilaria Cavazzana, Maria Orietta Borghi, and Angela Tincani. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. *BMC Medicine* 2014;12:(38):1-3.
- (12) Meroni PL, Schur PH. ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010;69:1420–1422
- 13) Mogens Fenger, Allan Wiik, Mimi Høier-Madsen, Jens J. Lykkegaard, Teresa Rozenfeld, Michael S. Hansen, Bente Danneskjold Samsøe, and Søren Jacobsen. Detection of Antinuclear Antibodies by Solid-Phase Immunoassays and Immunofluorescence Analysis. *Clin Chem* 2004;(50):2141–2147.

14) P. Kern, M. Kron, and K. Hiesche. Measurement of Antinuclear Antibodies: Assessment of Different Test Systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Section of Infectious Disease and Clinical Immunology, Germany Jan. 2000:72–78.