

ANTICOSSOS ANTI-NUCLEARS: UN PAS CAP A L'ESTANDARDITZACIÓ

Els anticossos anti-nuclears (ANA) són un grup heterogeni d'autoanticossos dirigits front a una gran varietat d'antígens localitzats tant al nucli com la membrana nuclear, aparell del fus mitòtic, citoplasma i altres orgànuls citoplasmàtics. Aquests estan presents al sèrum de pacients amb malalties autoimmunes, així com en altres pacients sense síndromes clínics definits.

Les malalties autoimmunes sistèmiques formen un grup de patologies amb una expressió clínica molt ampla i variada, i un curs crònic caracteritzat per comprometre múltiples òrgans. Dintre d'aquest grup es troben el lupus eritematós sistèmic, la polimiositis/ dermatomiositis, esclerosi sistèmica, artritis reumatoide, artritis crònica juvenil, malaltia mixta del teixit connectiu i la síndrome de Sjögren.

El diagnòstic d'aquestes malalties es difícil ja que solen debutar de manera inespecífica amb poliartàlgies, polimiàlgies, febre d'origen desconegut, alteració de la funció renal o hepàtica i hipergammaglobulinèmia. La presència d'ANA es considera criteri diagnòstic per a algunes d'aquestes patologies (*fig. 1*), fet que junt a la seva elevada sensibilitat fa de la seva determinació en sèrum una pràctica habitual e imprescindible pel seu estudi.

Box 1 Anti-nuclear antibody assay

Best screening test for SLE

- Sensitivity $\geq 95\%$
- Specificity is only 57% for SLE compared with related rheumatic and autoimmune disorders

Key diagnostic assay for:

- SSc (sensitivity 85%)
- SS (sensitivity 48%)
- Drug-induced lupus (sensitivity 100%)
- PM/DM (sensitivity 61%)
- JIA (sensitivity 57%)
- MCTD (sensitivity 100%)
- Autoimmune hepatitis (sensitivity up to 60%)

Important role in assessing prognosis in Raynaud's phenomenon [2].

DM, dermatomyositis; JIA, juvenile idiopathic arthritis; MCTD, mixed connective tissue disease; PM, polymyositis; SLE, systemic lupus erythematosus; SSc, systemic sclerosis; SS, Sjögren's syndrome.

Figura 1. Sensibilitat dels ANA en el diagnòstic de les malalties autoimmunes sistèmiques

Catlab Informa

La determinació d'ANA es realitza en mostres de sèrum, conservades a 4°C fins a un màxim de 72 hores o bé congelades a -20°C. Es poden detectar mitjançant diverses metodologies i diferents substrats antigènics, emprats amb la finalitat de capturar els autoanticossos circulants. Però la tècnica "gold estàndar" és la immunofluorescència indirecta (IFI) emprant cèl·lules tumorals de carcinoma de laringe humana (Hep-2) o variants d'aquesta línia cel·lular, com Hep-2000, que és la que fem servir al nostre laboratori per la seva major sensibilitat, la presència de nuclis i nuclèols de major mida, i la capacitat d'expressar antigens presents en diferents fases del cicle cel·lular, el que permet una millor visualització de les estructures i dels patrons de fluorescència.

El principal avantatge de la IFI com a mètode de screening per a la determinació dels ANA és la seva elevada sensibilitat. Aquesta metodologia és d'utilitat en l'estudi inicial d'un ampli espectre de connectivopaties, permet amb un sol test detectar la presència d'autoanticossos dirigits front a una ampla varietat d'autoantígens i establir el patró d'immunofluorescència que en alguns casos ja va associat a un determinat autoanticòs (per eixample els anticossos anti-centròmer).

D'una altra banda la IFI és una tècnica amb un procés laboriós que requereix una sèrie de dilucions dels sèrums positius i la seva posterior interpretació visual, junt amb l'establiment del títol i patró de fluorescència al microscopi. El procés de preparació dels portaobjectes per a la lectura de la IFI ha estat altament automatitzat als darrers anys, és la seva lectura i interpretació posterior el que comporta les principals limitacions. És un tècnica altament subjectiva, que requereix personal qualificat i experimentat per a la interpretació dels resultats i en la que intervenen múltiples factors en el resultat final (tipus de substrat, tipus de conjugat, tipus de fixació del substrat, característiques del microscopi,...). Per tant el principal desavantatge en la detecció dels ANA mitjançant IFI és que es tracta d'una metodologia de difícil estandardització i amb un alt grau de subjectivitat.

La incorporació de sistemes de lectura automatitzada dels ANA ha suposat un pas cap a la estandardització a nivell de la lectura al microscopi, així com una millora en el grau de subjectivitat. Aquests sistemes automatitzats de lectura es basen en un microscopi capaç de capturar i digitalitzar les imatges fluorescents dels portaobjectes, i un software amb capacitat d'interpretar el resultat com a negatiu/ dubtós/ positiu basant-se en l'índex de fluorescència que ha obtingut.

A l'àrea d'Immunologia del Catlab va ser incorporat el darrer mes el GSIGHT®, un analitzador que permet la lectura automatitzada dels ANA.

Catlab Informa

Mitjançant un procés de validació hem establert un punt de tall, que redueixi al màxim el nombre de falsos negatius augmentant la sensibilitat, i que permet classificar la mostra com a negativa/ dubtosa/ positiva, augmentant el grau d'objectivitat de la tècnica, principalment en el cas dels resultats negatius que suposen al voltant del 80% de les determinacions diàries.

Un cop realitzada la lectura els resultats són revisats, per al que es disposa de les imatges obtingudes per l'analitzador i de l'índex de fluorescència mesurat. Pel que fa a les mostres classificades com a positives continua sent necessari que siguin revisades manualment al microscopi per professionals qualificats, i així establir el títol d'ANA. En quant a la interpretació del patró de fluorescència, la capacitat d'aquests sistemes és limitada, el GSIGHT® pot arribar a reconèixer els cinc patrons "clàssics" (homogeni, clapat, nucleolar, centromèric, punts nuclears i mitocondrial), però basant-nos amb la nostra experiència i les dades publicades a la bibliografia aquesta capacitat és limitada, situant-se en un 63% de patrons d'ANA identificats correctament. Per aquest motiu l'establiment del patró de fluorescència requereix de la interpretació d'un professional.

Per tant la incorporació d'aquest sistema ha suposat una sèrie de millores com són augmentar el grau d'automatització dels ANA a nivell de la lectura de la immunofluorescència al microscopi, una major objectivitat en l'establiment dels resultats com a positius o negatius i disposar de manera informatitzada d'una base de dades amb històrics d'imatges acompanyades del títol i patró de fluorescència corresponent. Tot això ens permet superar algunes de les limitacions d'aquestes determinacions, oferint millores en la interpretació dels resultats, una eina pràctica tenint en compte la complexitat del diagnòstic autoimmune.

Bibliografia:

Recomendación SEQC 2014. Actualización en el manejo de los anticuerpos antinucleares en las enfermedades autoinmunes sistémicas.

Meroni et al. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. BMC Medicine 2014, 12:38

Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ. Current concepts and future directions for the assesment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antiodies. Journal of Immunology Research 2014, 18.

Catlab Informa

N. Bizzaro et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: A comparative study of six computer-aided diagnostic systems . Autoimmunity Reviews 13 (2014) 292–298

Sandra Calabuig

Immunologia

CATLAB

Tel. 93.748.56.00 - ext. 35035

scalabuig@catlab.cat

www.catlab.cat
