

# Autoanticuerpos detectados por inmunoensayo lineal en pacientes seronegativos por inmunofluorescencia\*

► María Cristina Fuente<sup>1</sup>, Nora Silvia Bovone<sup>1</sup>, Mario Omar Eposto<sup>2</sup>

- 
1. Bioquímica.
  2. Bioquímico. Jefe de Sección.

\* Area Proteínas-Autoinmunidad de la Sección Estudios Especiales. Servicio de Bioquímica del Hospital Nacional A. Posadas: Av. Pte. Illia y Marconi, El Palomar, Buenos Aires, Argentina.

## Resumen

Se conoce la existencia de un reducido subgrupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) que resultan persistentemente negativos durante el *screening* por inmunofluorescencia indirecta (IFI) para anticuerpos anti-núcleo (ANA) y, en todos estos casos, el uso de métodos más sensibles permite detectar principalmente los anticuerpos anti-Ro y anti-La. El objetivo del presente estudio es investigar el repertorio de autoanticuerpos detectados por inmunoensayo lineal (LIA) sobre muestras de suero que resultaron ANA negativas en el *screening* por IFI. Se recolectaron en forma no seleccionada 87 muestras que fueron negativas por IFI y además fueron procesadas por LIA. Se emplearon improntas de Hep-2 (Kallestad, Laboratorios Bio Rad, Redmond, WA, Estados Unidos) para IFI con una dilución inicial de 1/40 y para LIA se empleó un equipo comercial Innolia-ANA (Innogenetics, Ghent, Bélgica). Como resultado se encontró que 10 pacientes (11,3%) de la serie resultaron positivos por LIA. Es destacable que 8/10 (80%) presentó anti-Ro52 solo o junto a anti-Ro60 y/o anti-La. Le siguió en frecuencia anti-Ro60 (50%) y anti-La (40%). La relevancia de estos hallazgos la deberá dar el contexto clínico pues, si bien puede ser un hallazgo útil para el grupo de LES con *screening* persistentemente negativo, este caso se da con muy baja frecuencia y la situación más común es la de pacientes con historia de ANA positivo y tratamiento con corticoides. Es destacable la sensibilidad del LIA para detectar estos anticuerpos.

**Palabras clave:** autoanticuerpos \* inmunofluorescencia indirecta \* inmunoensayo lineal.

## Summary

### **AUTOANTIBODIES DETECTED BY LINE IMMUNOASSAY IN SERONEGATIVE PATIENTS BY IMMUNOFLUORESCENCE**

*It is known that there is a reduced subgroup of patients with systemic erythematosus lupus (SEL) that result persistently negative to antibodies anti-nucleus (ANA) during the screening by indirect immunofluorescence (IIF) and, in all of those cases, the use of more sensitive methods allows to detect primarily the anti-Ro and anti-La antibodies. The aim of this study is to investigate the repertory of antibodies detected by line immunoassay*

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

*screening. 87 negative samples by IIF were collected and then processed by LIA. For the IIF, Hep-2 slides (Kallestad) with an initial dilution of 1/40 were used. For the LIA, Innolia-ANA commercial kit (Innogenetics) was used. As a result, it was found that 10 patients (11,3%) resulted positive for LIA. It is significant that 8/10 (80%) presented only anti-Ro52 or anti-Ro52 and anti-Ro60 and/or anti-La. Anti-Ro60 (50%) and anti-La (40%) follow in frequency. The relevance of these findings will be determined by the clinical context. Even though these findings could be useful for the LES group with persistently negative screening, these cases have very low frequency and the most common situation is that of patients with a history of positive ANA and corticoids treatment. The sensitivity of LIA to detect these antibodies is significant.*

**Key words:** \* autoantibodies \* indirect immunofluorescence \* line immunoassay.

## Introducción

Ante la sospecha de una enfermedad autoinmune sistémica se realiza habitualmente la detección sérica de autoanticuerpos. La metodología más empleada aún para ello es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) que usa como sustrato cortes de tejido, como hígado de rata o en forma preferencial por su mayor sensibilidad, células Hep-2, una línea celular tumoral de origen humano (1-3). A este estudio serológico suelen agregarse otros como factor reumatoideo, C3, C4, PCR, etc.

En general, cuando el resultado del estudio inicial para anticuerpos anti-núcleo (ANA) es negativo y no se reúnen los criterios clínicos necesarios para el diagnóstico, se puede descartar la posibilidad de enfermedad autoinmune sistémica (4) (5). No obstante, hay que tener presente que existen entidades autoinmunes, como por ejemplo, la artritis reumatoidea seronegativa, las formas iniciales de la esclerodermia y la dermatomiositis, que pueden cursar con ANA negativos. Asimismo, se conoce la existencia de un reducido subgrupo de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) y con ANA negativo por IFI que puede estar asociado con manifestaciones clínicas tales como fotosensibilidad, *rash* cutáneo, bloqueo cardíaco congénito y en general, con una forma más leve de enfermedad sistémica. Si bien en estos pacientes los resultados de la IFI para ANA son persistentemente negativos durante el curso de la enfermedad, el empleo de métodos de laboratorio más sensibles y específicos permite detectar principalmente a los anticuerpos anti-Ro (SSA) y anti-La (SSB) pertenecientes al grupo anti-ENA (ENA: antígenos nucleares extraíbles) (6) (7). La detección por el laboratorio de estos anticuerpos en el citado grupo de pacientes aporta un elemento útil, pues en muchos casos permite acortar el tiempo del diagnóstico y el de inicio del tratamiento. Sobre esta base se pueden generar requerimientos para anti-ENA aun en pacientes que resultan ANA negativos por IFI. Así pues, el objetivo del presente estudio fue: a) Investigar

el repertorio de autoanticuerpos detectados por inmunoensayo lineal (LIA) sobre muestras de suero que resultaron ANA negativo en el *screening* sobre Hep-2. b) Investigar la relevancia clínica de estos hallazgos.

## Materiales y Métodos

En forma no seleccionada, se recolectaron retrospectivamente 87 muestras de suero que fueron negativas por IFI y a las que se había efectuado el estudio de anticuerpos específicos por LIA, constituyendo la población en estudio. Las historias clínicas de los pacientes que resultaron positivos para algún autoanticuerpo por LIA fueron examinadas para verificar el diagnóstico. La IFI se efectuó empleando improntas de Hep-2 (Kallestad) con una dilución inicial del suero de 1:40. Todo resultado positivo en esta dilución de *screening* se tituló comenzando por 1:100. Todo *test* negativo en dicha dilución se informó como negativo. Los anticuerpos específicos se investigaron por un LIA comercial Innolia ANA (Innogenetics). Este es un enzimoimmunoensayo lineal, multi-paramétrico que emplea antígenos naturales para la detección de anti-SSA/Ro60 y anti-histona, antígenos sintéticos para anti-ribosomal P y recombinantes para anti-SmB, anti-RNP-70k, anti-RNP-A, anti-RNP-C, anti-SSA/Ro52, anti-SSB/La, anti-CenpB, anti-Scl70 y anti-Jo1.

## Resultados

La prevalencia de sueros positivos se observa en la Tabla I donde 10 de 87 (11,3%) resultaron positivos para al menos uno de la batería de autoanticuerpos detectados por LIA. La distribución de los mismos por paciente se observa en la Tabla II. Es destacable que 8/10 (80%) presentaron anti-SSA/Ro 52 ya sea solo o acompañado por anti-SSA/Ro 60 y/o anti-SSB/La. La prevalencia de estos tres anticuerpos en los 10 pacientes se muestra en la Tabla III.

Tabla I. Prevalencia de anticuerpos detectados por inmunoensayo lineal

LIA - n (%)	LIA + n (%)	TOTAL n
77 (88,7)	10 (11,3)	87

Tabla II. Distribución por paciente de los autoanticuerpos detectados por inmunoensayo lineal

Pacientes	Ro 52	Ro 60	La	Hist.	Scl 70
1	x				
2	x				
3	x	x			
4	x	x			
5	x	x	x		
6	x	x	x		
7	x		x		
8	x	x	x	x	
9				x	
10					x

Tabla III. Frecuencia de anti-Ro 52, anti-Ro 60 y Anti-La en los 10 pacientes que resultaron positivos por inmunoensayo lineal

Anticuerpos	Ro 52 (n)	Ro 60 (n)	La (n)
Unicos	2		
Asociados	6	5	4
Total n (%)	8 (80)	5 (50)	4 (40)

## Discusión

Según los resultados expuestos, el anticuerpo más frecuentemente hallado es el anti-SSA/Ro52, solo o acompañado por anti-SSA/Ro60 o anti-SSB/La. Ningún suero presentó anti-SSA/Ro60 o anti-SSB/La como única especificidad. Como primera consideración, estos hallazgos no deben sorprender, pues es conocido el hecho de que las moléculas SSA/Ro52KD son de localización principalmente citoplasmática; en consecuencia, es esperable una baja o aun ausente fluorescencia nuclear. Sumado a la baja densidad nuclear sobre Hep-2, este antígeno puede ser parcialmente lavado o solubilizado durante el proceso de fijación y permeabilización, lo cual reduce más aún la sensibilidad de este sustrato para su detección (8-10).

En segundo lugar, la declinación de los niveles de anti-SSA/Ro puede ocurrir cuando el paciente está inmunodeprimido. En el 20-25% de pacientes tratados, los niveles de anti-SSA/Ro pueden hacerse indetectables por las técnicas de difusión en gel aunque la situación usual es que los títulos no fluctúen notablemente ni con la actividad de la enfermedad ni con el trata-

miento (11-13). En esta serie de 10 pacientes, sólo fue posible contar con datos precisos inherentes al diagnóstico y tratamiento previo en 6 de ellos, por lo que no se pudo relacionar en forma concluyente la patología con el hallazgo serológico. Tres pacientes: 6, 7, y 8 de Tabla II tenían diagnóstico de lupus con historia previa de ANA positivo y tratamiento con corticoides. El paciente 4 de Tabla II era una niña de 12 años con diagnóstico de cerebelitis de probable etiología autoinmune y fue tratada desde el inicio con corticoides y luego con ciclofosfamida. En sucesivos estudios esta niña presentó resultados siempre positivos para anti-Ro con ANA por IFI que alternaba entre negativo, moteado 1/100 y moteado 1/200. El paciente 5 tenía una artritis reumatoidea diagnosticada en 1996 tratada con prednisona. Tenía historia previa de ANA positivo moteado 1/200. El paciente 10 se presentó con una uveítis anterior de probable causa reumatológica (como artritis reumatoidea juvenil, Síndrome de Reiter o LES). El estudio para ANA siempre fue negativo por IFI y por LIA se encontró una marca débil para anti-Scl70. El seguimiento de este paciente no fue posible ya que no concurrió más a consulta luego de su tratamiento inicial con corticoides. Evidentemente, al menos la mitad de estos 10 pacientes contaban con historia previa de ANA positivo por IFI y tratamiento con corticoides.

Con respecto al grupo de pacientes con LES y *screening* para ANA persistentemente negativo, es baja la prevalencia de 0,64% encontrada por otros autores como Thompson *et al* y los estudios realizados por Manoussakis *et al* (14) que refieren 0.4%, por lo tanto, el tamaño de la población estudiada aquí hizo poco probable encontrar pacientes pertenecientes a este grupo.

## Conclusiones

Los anticuerpos anti-SSA/Ro y anti-SSB/La resultaron ser los más frecuentemente detectados por LIA en pacientes con ANA negativo por IFI. Si bien este hallazgo es útil en pacientes con LES clínico y *screening* negativo, este subgrupo es muy pequeño y debe ser investigado específicamente en población no tratada y que cumpla con criterios clínicos de LES. En esta serie de pacientes, al menos la mitad de los hallazgos puede obedecer al descenso de título por efecto del tratamiento, destacándose la mayor sensibilidad del LIA con respecto a la IFI para detectar estos anticuerpos.

### CORRESPONDENCIA

DRA. NORA BOVONE  
Gelly y Obes N° 620  
1706 HAEDO  
Provincia de Buenos Aires, Argentina  
Tel particular: 54-11-4658-8083  
E-mail: norasil@sinectis.com.ar

## Referencias bibliográficas

1. Homburger HA. Cascade testing for autoantibodies in connective tissue diseases. *Mayo Clinic Proceedings* 1995; 70(2): 183-4.
2. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon D, Homburger HA. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 71-81.
3. Feltkamp TEW. Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 723-7.
4. Condemi JJ. The autoimmune diseases. *JAMA* 1992; 268: 2882-92.
5. Tan EM, Feltkamp TEW, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1601-11.
6. Pourmand N, Blomberg S, Rönnblom L, Karisson-Parra A, Wahren-Herlenius. Ro 52KD autoantibodies are detected in a subset of ANA-negative sera. *Scand J Rheumatol* 2000; 29: 116-23.
7. Thomson KF, Murphy A, Goodfield MJD, Misbah SA. Is it useful to test for antibodies to extractable nuclear antigens in the presence of a negative antinuclear antibody on Hep-2 cells?. *J Clin Pathol* 2001; 54(5): 413.
8. Peek R, Pruijn GJM, Vanderkemp AJW, van Venrooij WJ. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J Cell Sci* 1993; 106: 929-35.
9. Simons FHM, Pruijn GJM, van Venrooij WJ. Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into the *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol* 1994; 125: 981-8.
10. Peene I, Van Ael W, Vandenbossche M, Vervaeke T, Veys E, De Keiser F. Sensitivity of the Hep-2000 substrate for the detection of anti-SSA/ro60 antibodies. *Clin Rheumatol* 2000; 19: 291-5.
11. Reichlin M, Hal Scofield R. SS-a (Ro) Autoantibodies. En: Peter JB, Shoenfeld Y, editors. *Autoantibodies*. Amsterdam: Elsevier Science BV; 1996. p. 783-8.
12. Ben-Chetrit E. The molecular basis of the SSA/Ro antigens and the clinical significance of their autoantibodies. *Br J Rheumatol* 1993; 32: 396-402.
13. Scofield RH, Farris AD, Horsfall AC, Harley JB. Fine specificity of the autoimmune response to the SSA/Ro and SSB/La ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* 1999; 42: 199-209.
14. Manoussakis MN, Garalea KL, Tzioufas AG. Testing for antibodies to ENA and to dsDNA is not indicated in FANA-negative sera. *Clin Rheumatol* 1988; 7: 465-9.

Aceptado para su publicación el 27 de agosto de 2004