

## Niveles de anticuerpos anti nucleares por FANA y ANA-LIA en pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas

### Levels of anti-nuclear antibodies by FANA and ANA-LIA in systemic rheumatic diseases patients

Carmen Estefanía Rosales E.<sup>1</sup>, Luis Fernando Sosa T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hospital Municipal La Portada, La Paz- Bolivia

<sup>2</sup> Universidad Mayor de San Andrés, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Instituto de Servicios de Laboratorio de Diagnóstico e Investigación en Salud. Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética, La Paz- Bolivia

Recibido: Septiembre 25 de 2020

Aceptado: Diciembre 10 de 2020

\*Correspondencia del autor: Carmen Estefanía Rosales Espinoza  
E-mail: carmen.rosales.e90@gmail.com

<https://doi.org/10.47499/revistaaccb.v1i32.216>

#### Resumen

**Objetivo:** Correlacionar los niveles de anticuerpos antinucleares obtenidos por las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (FANA) e inmunoensayo lineal (ANA-LIA) en pacientes diagnosticados o con sospecha clínica de enfermedad autoinmune. **Métodos:** Se incluyeron 100 pacientes que dieron su consentimiento informado para participar en el estudio. Los ensayos e interpretación de los resultados de las pruebas de FANA y ANA-LIA se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante. **Resultados:** el 97,4% de los pacientes estudiados eran de sexo femenino con edad promedio de 42 años, siendo la Artritis reumatoide, Poliartritis y Lupus Eritematoso Sistémico las enfermedades que con mayor frecuencia acompañaron la solicitud médica. Se observó que ambos métodos fueron positivos en el 21% de los casos y que el índice de correlación de Kappa entre las pruebas fue moderado ( $k=0,51$ ;  $p<0,05$ ), la sensibilidad y especificidad de los métodos fue del 71,4% y 84,8% respectivamente, se observó también que para un determinado patrón fluorescente puede haber positividad de más de un antígeno de la prueba de ANA-LIA y viceversa. **Conclusiones:** FANA es el método de tamizaje aceptado en la práctica clínica para orientar hacia un diagnóstico clínico de enfermedad autoinmune más probable, debido a la subjetividad en la interpretación de sus resultados y necesidad de entrenamiento en la identificación de los patrones fluorescentes, se requiere del apoyo de otros métodos de laboratorio que permitan identificar con mayor precisión los antígenos reconocidos por los autoanticuerpos, ANA-LIA es una herramienta de laboratorio costo-efectiva de elevada sensibilidad y especificidad que se ajusta a este requerimiento.

**Palabras clave:** anticuerpos antinucleares, biomarcadores, enfermedades autoinmunes, inmunofluorescencia, inmunolineal, nitrocelulosa, patrón fluorescente, sistema inmune. (MeSH).

## Abstract

**Objective:** To correlate levels of antinuclear antibodies obtained by indirect immunofluorescence techniques (FANA) and linear immunoassay (ANA-LIA) in patients diagnosed or with clinical suspicion of autoimmune disease. **Methods:** 100 patients who gave their informed consent to participate in the study were included. Assays and interpretation of results of FANA and ANA-LIA test were performed following the manufacturer's recommendations. **Results:** 97,4% of the patients studied were female with an average age of 42 years, being rheumatoid arthritis, polyarthritis and systemic lupus erythematosus the diseases that most frequently accompanied the medical request. It was observed that both methods were positive in 21% of the cases and that the Kappa correlation index was moderate between the tests ( $k = 0,51$ ;  $p < 0,05$ ), the sensitivity and specificity of the methods was 71,4% and 84,8% respectively. It was also observed that for a given fluorescent pattern there may be positivity of more than one antigen of the ANA-LIA test and vice versa. **Conclusions:** FANA is the screening method accepted in the clinical practice to guide towards a more probable clinical diagnosis of autoimmune disease. Due to the subjectivity in the interpretation of its results and the need for training in the identification of fluorescent patterns, the support of other laboratory methods that allow the identification of antigens recognized by autoantibodies with greater precision is necessary, ANA-LIA is a cost-effective laboratory tool of high sensitivity and specificity that meets this requirement.

**Keywords:** Antinuclear antibodies, biomarkers, autoimmune diseases, immunofluorescence, line immunoassay, nitrocellulose, fluorescent pattern, immune system. (MeSH).

## INTRODUCCIÓN

Durante su proceso de maduración las células del sistema inmune adaptativo adquieren la capacidad de reconocer lo propio y atacar lo no propio o extraño. Ante circunstancias no bien conocidas el sistema inmune adaptativo deja de tolerar lo propio, ocasionando procesos inflamatorios crónicos, que afectan a uno o más órganos y sistemas (1), ello se atribuye a errores o defectos en el sistema inmune y su incapacidad de controlar o eliminar patógenos que a su vez cuentan con mecanismos de evasión inmune bien desarrollados. (2,3).

Se conoce que en función a la raza y las condiciones medio ambientales en la que viven los individuos, del 5 al 10% de la población padece enfermedades autoinmunes y que estas afectan principalmente a mujeres en edad fértil o productiva. A pesar de la alta morbilidad y mortalidad que muestran las enfermedades autoinmunes no se conoce con exactitud la causa predisponente por lo que estas aun siguen siendo desconocidas. (4).

La descripción y características de los diferentes autoanticuerpos son importantes en el diagnóstico, predicción y pronóstico de las distintas enfermedades autoinmunes. Desde hace mucho tiempo los anticuerpos anti nucleares identificados en el sustrato celular Hep-2 medidos por inmunofluorescencia indirecta son considerados "Gold Standard" debido a que permite identificar un poco más de 100 antígenos en el núcleo y citoplasma de las células HEp-2 lo cual lo convierte en una herramienta útil para el tamizaje, detección y seguimiento de enfermedades reumáticas. (5).

Si bien se han implementados métodos de fase sólida para la detección de anticuerpos antinucleares mediante métodos de ELISA, inmuno-blot, y ensayos multiplex, estos incluyen un número limitado de antígenos lo cual implica la posibilidad de resultados falsos negativos con limitación en la sensibilidad diagnóstica de la prueba. El hecho que sea considerada un test de tamizaje para determinadas enfermedades autoinmunes como el Lupus, o Síndrome de Sjögren, entre otros, requiere el uso de otros test de laboratorio de mayor especificidad diagnóstica, como el ELISA, inmunoblot, MBIA, etc. (6).

En casos de que el perfil clínico de la enfermedad autoinmune varíe significativamente, es necesario que de la mano del método de FANA vaya un método de detección de antígenos de mayor especificidad lo cual evita en gran manera el diagnóstico una enfermedad autoinmune o reumática erróneamente. (7).

En los últimos años se ha sugerido emplear y evaluar diferentes biomarcadores para la detección y monitoreo de enfermedades autoinmunes. La detección de anticuerpos anti nucleares por ANA-LIA es un test de laboratorio que emplea antígenos recombinantes purificados del núcleo y citoplasma celular que comúnmente son blanco del reconocimiento de los denominados anticuerpos antinucleares en el test de FANA, lo cual mejora la especificidad diagnóstica en pro del diagnóstico, pronóstico y seguimiento de diferentes trastornos autoinmunes. (7,8).

Existen publicaciones científicas realizadas en diferentes países que han evaluado el grado de correlación o concordancia de los test de laboratorio de inmunofluorescencia indirecta e inmunoblot para la detección de anticuerpos anti nucleares y/o citoplasmáticos; en función del lugar del estudio realizado y de la marca de los estuches comerciales que fueron empleados en dichos estudios, los valores de correlación y concordancia obtenidos varían de un estudio a otro. Debido a que los perfiles característicos de los autoanticuerpos se encuentran en diferentes enfermedades, la determinación de la especificidad ayuda a establecer el diagnóstico correcto y facilita el tratamiento y seguimiento al paciente. Algunos de estos anticuerpos son indicadores muy sensibles de una determinada enfermedad y otros anticuerpos son más específicos. (9-12).

El objetivo principal de este estudio fue correlacionar los niveles de anticuerpos antinucleares obtenidos por las técnicas de FANA y ANA-LIA en pacientes diagnosticados o con sospecha clínica de enfermedades autoinmunes.

## MATERIAL Y METODOS

### Descripción de la población

#### 1. Criterios de inclusión

**Grupo caso.** - Pacientes que asistieron al Instituto SELADIS, con sospecha clínica de alguna enfermedad autoinmune.

**Grupo control.** - Personas que no presenten antecedentes clínicos de alguna enfermedad autoinmune y sin antecedentes familiares de enfermedad autoinmune, personas que no estén cursando enfermedades infecciosas y que no se estén administrando medicamentos.

#### 2. Criterios de exclusión

Pacientes de quienes no contaban con expediente clínico completo o que pese a dar su consentimiento informado para el estudio no asistieron a la toma de muestras

**Tamaño de muestra.** - Se incluyeron muestras de 100 pacientes con sospecha clínica de alguna enfermedad autoinmune, quienes acudieron al Laboratorio de Histocompatibilidad e Inmunogenética del Instituto SELADIS entre los meses de junio 2018 y agosto del 2019, a los cuales se les realizaron las siguientes determinaciones serológicas: FANA y ANA-LIA.

**Naturaleza de la muestra.** - Muestra de sangre venosa. A los participantes se les colectó 5ml de sangre venosa, a partir de la cual se obtuvo el suero que fue guardado a

-20°C hasta el momento de su uso.

**Análisis estadístico.** - El presente estudio fue de tipo transversal descriptivo. El análisis de datos se realizó con ayuda de la base de datos Excel 2013. Los resultados de los análisis de las variables continuas se expresaron como porcentaje, media y rango.

Para datos no apareados de acuerdo a las características de cada test se empleó (Chi Cuadrado). Para medir la concordancia de frecuencias de las variables cualitativas se utilizó índice de Kappa de Cohen clasificándose los niveles de concordancia de la siguiente manera: (0,00 Pobre), (0,001-0,20 Deficiente), (0,21-0,40 Aceptable), (0,41-0,60 Moderada), (0,61-0,80 Considerable), (0,81-1,00 Casi perfecta).

**Aspectos bioéticos.** - El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Mayor de San Andrés, La Paz - Bolivia (registro CEI-UMSA 0416), todos los pacientes involucrados en el estudio dieron consentimiento y asentimiento informado para el procesamiento de muestras y uso de datos de forma confidencial.

**Pruebas de inmunofluorescencia indirecta.**- Los FANA fueron determinados siguiendo las instrucciones del fabricante del estuche comercial (Orgentec, Alemania), la prueba utilizó como sustrato improntas de células cancerígenas HEp-2 y anticuerpos anti IgG humano conjugado con FITC, las muestras fueron procesadas a simple siego según se indica.

Las muestras fueron evaluadas a las diluciones 1:40, 1:80 y 1:160, diariamente se incluyeron controles positivos y negativos (proporcionados por el estuche comercial). Se sembró 30 µl de la dilución correspondiente y de los controles en los pocillos de las placas con sustrato celular, se incubó por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Luego, para remover los anticuerpos no sensibilizantes se lavaron las placas cuidadosamente con pizeta y se sumergieron en PBS por 10 minutos. Posteriormente, las placas se secaron y llevaron a cámara húmeda, se añadió a cada pocillo 30 µl de anticuerpo IgG conjugado con isotiocianato de fluoresceína e incubó en oscuridad por 30 minutos. Para eliminar los anticuerpos conjugados que no se unieron a los anticuerpos sensibilizantes se lavaron las placas nuevamente como se mencionó previamente. Se añadió a cada pocillo una gota del medio de montaje previsto por el estuche comercial y se cubrió la placa con cubre

objetos. Finalmente, se realizó la visualización de los patrones fluorescentes a un aumento de 40X. Se consideraron muestras positivas cuando se observó patrón fluorescente con intensidad de fluorescencia 1+ o mayor a partir de la dilución 1/160 de la muestra.

**Pruebas de ensayo inmunolineal.**- La determinación de anticuerpos IgG por ANA-LIA (Euroimmun, Alemania), capaz de simplificar la detección de autoanticuerpos contra 22 antígenos claves que también se pueden observar por el sistema de prueba IFA en sustratos celulares HEP-2. Los siguientes antígenos se inmovilizan en las tiras de prueba: PM-Sc1100, PM-Sc175, SSA/Ro52, SSA/Ro60, Jo1, Ribo-P, nucleosomas, ADN, histonas, Sm, U1SnRNP68, U1SnRNP A, U1SnRNP C, SSB/La, Sc170, CENP-B, PCNA, Mi2, Ku, SRP54, AMA-M2 y DFS70 (LEDGF). Además de las líneas de antígenos, se facilita una línea de control de corte, de suero y de conjugado en la parte inferior de la tira.

Las muestras se procesaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Los biomarcadores incluidos en el estuche son marcadores diagnósticos de las siguientes enfermedades: Lupus Eritematoso Sistémico (LES), síndrome de Sjögren, síndrome de Sharp, Esclerosis sistémica progresiva, Polimiositis/Dematomiositis, síndrome de CREST, Lupus Discoide, enfermedad mixta de tejido conectivo, Colangitis Biliar Primaria (CBP) y Hepatitis autoinmune (AIH)

Cada lámina de nitrocelulosa del estuche ANA-LIA contó con el control interno de calidad correspondiente que mediante el software EuroLineScan (Euroimmun, Alemania) permitió definir la positividad o negatividad de los anticuerpos anti antígenos presentes en la lamina. El software clasificó los resultados de las muestras respecto a la intensidad de la reacción de color del suero control según se indica: 0-5 Negativo (-), 6-10 Dudoso (+), 11-25 Positivo débil (++) , 26-50 Positivo (+++), >50 Positivo fuerte (++++).

## RESULTADOS

Las características demográficas de los pacientes con sospecha clínica de enfermedades autoinmunes se resumen en la *Tabla 1*. Se observó que el promedio de edad de los pacientes estudiados fue de 42 (18-89) años y que el 89.0% de los pacientes eran mujeres. Se evidenció que en el 40% de los casos las solicitudes clínicas no se incluía el diagnóstico presuntivo. Se pudo evidenciar que los diagnósticos clínicos más frecuentes en pacientes que solicitaron las pruebas de FANA y ANA-LIA fueron: Artritis Reumatoide (12,0%), Poliartritis (12,0%), Lupus Eritematoso Sistémico (10,0%), Enfermedad Mixta de Tejido Conectivo (5,0%) y fenómeno de Raynaud (5,0%). De manera interesante se observó que en este grupo de pacientes en el 26.0% de los casos se obtuvo resultados positivos de ANA-LIA y solo el

**Tabla 1.** Características clínicas de los pacientes con sospecha clínica de enfermedades de tejido conectivo incluidos en el estudio

Características evaluadas	Porcentaje
Número	100
<b>Género femenino</b>	89,0%
<b>Género masculino</b>	11,0%
<b>Edad promedio (años)</b>	42 (18-89)
<b>Diagnóstico presuntivo</b>	
<b>Sin diagnóstico Presuntivo</b>	40,0%
<b>Artritis Reumatoide</b>	12,0%
<b>Poliartritis</b>	12,0%
<b>Lupus Eritematoso Sistémico</b>	10,0%
<b>Enfermedad mixta de tejido conectivo</b>	5,0%
<b>Fenómeno de Raynaud</b>	5,0%
<b>Síndrome de Sjögren</b>	3,0%
<b>Porcentaje de anticuerpos anti Nucleares (FANA) (Positivo)</b>	21,0%
<b>Porcentaje de anticuerpos anti Nucleares (FANA) (Negativo)</b>	79,0%
<b>Porcentaje de ANA-LIA (Positivo)</b>	26,0%
<b>Porcentaje de ANA-LIA (Negativo)</b>	74,0%

En la *Tabla 2* se muestra la frecuencia en la que se observó positividad de los diferentes antígenos evaluados en la prueba de ANA-LIA, el 9% presentaba bandas cuya intensidad de señal fue interpretada como dudosa y el restante 64% fueron asignadas por el software como negativas verdaderas (índice de reacción menor a 5), se resalta para fines del presente estudio los resultados dudosos fueron considerados como negativos. Por lo tanto, las muestras negativas correspondieron al 73% de los casos.

Por otra parte, en el 27% de los casos se observaron bandas con intensidad positiva que según la asignación del software del kit comercial variaban de una (+) a tres cruces (+++), los antígenos reconocidos por los anticuerpos de los pacientes más frecuentemente encontrados solos o en combinación con otros antígenos fueron: SS-A (8/27), DSF70 (5/27) y PM-Scl75/100 (5/27).

**Tabla 2.** Distribución específica de antígenos detectados por ANA-LIA en pacientes con sospecha clínica de enfermedad de tejido conectivo

ANTIGENO DETECTADO	INTENSIDAD DE LA REACCION					TOTAL
	Negativo	+/-	+	++	+++	
<b>Negativo</b>	64					64
<b>CENP B= 30; CENP A= 18</b>				1		1
<b>DFS70</b>		1	2	2		5
<b>PML=13</b>			1			1
<b>ds DNA</b>		1				1
<b>Jo-1</b>		1				1
<b>Ku</b>		1				1
<b>Mi-2</b>				1		1
<b>nRNP= 77; SS-A=45</b>					1	1
<b>Nucleosoma</b>		1	2			3
<b>Pm Scl 75/100</b>		1	3		1	5
<b>PM-Scl 100</b>			1			1
<b>RP155</b>		1	2			3
<b>Sm</b>				1		1
<b>Sm/RNP</b>			1			1
<b>Sp100</b>		1			1	1
<b>CENP A= 71; CENP B=63</b>					1	1
<b>SSA</b>		1	1		2	4
<b>Ro-52= 78; SSB= 64; SSA= 53</b>					1	1
<b>Ro52= 80; SSA= 59</b>					1	1
<b>Ro52=93; Scl70=78; SSA=72</b>					1	1
<b>TOTAL</b>	<b>64</b>	<b>9</b>	<b>13</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>100</b>

*Nota. Fuente propia*

Mi-2= Dermatomiositis aguda, Polimiositis; ds DNA= Lupus Eritematoso Sistémico (LES), LES-Neonatal, Artritis Reumatoide (AR), Hepatitis autoinmune (HAI); Sm= LES, Enfermedad Mixta Tejido Conectivo (EMTC), VEB; SS-A= LES, Síndrome de Sjögren (SS), Lupus Discoide, AR, SS-B= LES, SS, Lupus Discoide, AR, LES Subagudo; DFS70= Enfermedades Reumáticas, Dermatitis atópica; Nu= LES, LES Neonatal, EMTC, AR, SS; PM100=Miositis Idiopática, esclerodermia; anti nRNP= EMTC, LES, Esclerodermia, AR, SS; anti CENP-A y anti CENP-B LES, Esclerodermia, síndrome de Crest, AR; PCNA= 5% en LES, Colangitis Biliar Primaria (CBP), Infección por virus Epstein Barr (VEB); Ro-52= SS, LES neonatal; Sm/RNP= EMTC, SS, Esclerosis Sistémica; Scl-70= Esclerosis Sistémica, Dermatomiositis, Polimiositis; RP155= Dermatomiositis, Polimiositis, Esclerosis Sistémica; Pm Scl 75/100= Polimiositis, Dermatomiositis; Ku= Dermatomiositis aguda, Polimiositis

En la *Tabla 3* se observan los diferentes patrones fluorescentes obtenidos en la prueba de FANA, las muestras que presentaron fluorescencia a título  $\leq 1/80$  se consideraron negativas. De las 100 muestras analizadas el 79% fueron negativas, en estas muestras el patrón granular fino se observó en el 29% de los casos.

Las muestras positivas para FANA (título  $\geq 1/160$ ) representaron el 21% de los casos y los patrones comunmente identificados fueron: granular grueso 5%, nucleolar 4% y granular fino 3%.

**Tabla 3.** Patrones de tinción de anticuerpos antinucleares (FANA) detectados por Inmunofluorescencia Indirecta en pacientes con sospecha clínica de enfermedades de tejido conectivo.

Patrones fluorescentes (FANA)	Positivo Título $\geq 1/160$ n= 21	Negativo Título $\leq 1/80$ n= 79	Total
Negativo (ausencia de patrón fluorescente)		4 (5,0%)	4
Centriolar	1 (4,8%)	4 (5,0%)	5
Centriolar/ Citoplasmático Reticular	1 (4,8%)		1
Centriolar /Granular Fino		6 (7,6%)	6
Citoplasmático	1 (4,8%)	4 (5,0%)	5
Citoplasmático Reticular		2 (2,5%)	2
Citoplasmático/ Centriolar		1 (1,3%)	1
Citoplasmático Fibrilar Segmentado		1 (1,3%)	1
Citoplasmático/ Granular Fino	1 (4,8%)	9 (11,4%)	10
Citoplasmático/ Granular Grueso		1 (1,3%)	1
Citoplasmático/ Nucleolar Homogéneo		1 (1,3%)	1
Difuso/ PCNA	1 (4,8%)	0 (0%)	1
Granular Fino	3 (14,2%)	29 (36,7%)	32
Granular Fino Denso		2 (2,5%)	2
Granular Fino/ Centriolar/ PCNA	1 (4,8%)		1
Granular Fino/ Citoplasmático Reticular	1 (4,8%)		1
Granular Fino/ Puente Intercelular		8 (10,1%)	8
Granular Grueso	5 (23,8%)	4 (5,0%)	9
Nucleolar	4 (19,0%)	2 (2,5%)	6
Nucleolar /Puente Intercelular	1 (4,8%)		1
Puente Intercelular	1 (4,8%)		1
Puente Intercelular/ Centriolar		1 (1,3%)	1
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>79</b>	<b>100</b>

En la *Tabla 4* se comparan los resultados entre la intensidad de reacción de ANA-LIA frente a los resultados de la prueba de FANA. Se determinó que 67 de 100 pacientes presentaron resultados negativos por ambas pruebas, y 15 pacientes presentaron resultados positivos por ambos test de laboratorio. Se observó 12 casos positivos para ANA-LIA y negativos para FANA y 6 casos positivos para FANA y negativos para ANA-LIA.

Los resultados demostraron que en el 82% de los casos existió concordancia de resultados positivos y negativos por ambas pruebas, el índice de correlación de Kappa de Cohen entre los métodos estudiados fue de 0,51 “concordancia moderada”. La especificidad diagnóstica encontrada fue del 84,8%, la sensibilidad del 71,4%, el valor predictivo negativo de la prueba es 91,8%, siendo el valor de Odds ratio diagnóstico de 14,0 ( $p = 0,005$ ).

**Tabla 4.** Resultados del índice de Kappa y valor diagnóstico de los anticuerpos anti nucleares y ANA LIA en pacientes con sospecha de enfermedades de tejido conectivo.

Positividad ANA-LIA	Anticuerpos Anti nucleares Positivo ≥ 1/160	Anticuerpos Anti nucleares Negativo ≤ 1/80	Total
Negativo 0-10 (-)	6	67	73
Positivo débil 11-25 (+)	5	8	13
Positivo 26-50 (++)	2	3	5
Positivo Fuerte ≥ 50 (+++)	8	1	9
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>79</b>	<b>100</b>
<b>Negativo 0-10</b>			
6			
67			
73			
Positivo 11-50	15	12	27
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>79</b>	<b>100</b>
<b>% de Concordancia</b>			<b>82,0%</b>
<b>Chi cuadrado (X<sup>2</sup>)</b>			<b>36,8 (p= 0,001)</b>
<b>Índice de Kappa</b>			<b>0,51 (0,30 a 0,71)</b>
<b>Sensibilidad</b>			<b>71,4%</b>
<b>Especificidad</b>			<b>84,8%</b>
<b>Valor predictivo positivo</b>			<b>55,6%</b>
<b>Valor predictivo negativo</b>			<b>91,8%</b>
<b>Proporción de falsos positivos</b>			<b>15,2%</b>
<b>Proporción de falsos negativos</b>			<b>28,6%</b>
<b>Exactitud</b>			<b>82,0%</b>
<b>Odds ratio diagnóstica</b>			<b>14,0</b>

Por otra parte, se hizo un análisis para determinar de qué manera se asocian los patrones fluorescentes de la prueba de FANA con las especificidades antigénicas de

la prueba de ANA-LIA (*tablas 5*). Se observó que diferentes patrones de FANA pueden estar asociados a uno o más antígenos de ANA-LIA. (ver *tabla 5*)

**Tabla 5.** Distribución específica de antígenos detectado por ANA-LIA y patrones de tinción de anticuerpos antinucleares (FANA) detectados por Inmunofluorescencia Indirecta en pacientes con sospecha clínica de enfermedades del tejido conectivo.

Patrones fluorescentes ANA-LIA	Patrones fluorescentes
CENP A	Centriolar, Citoplasmático
CENP B	Centriolar, Citoplasmático
DFS70	Citoplasmático, Granular Fino, Granular Fino Denso
Mi-2	Citoplasmático
Nucleosoma	Difuso, PCNA, Granular Fino
Pm Scl 75/100	Centriolar, Granular Fino, PCNA, Nucleolar
PM-Scl 100	Negativo
PML	Citoplasmático
RP155	Centriolar, Citoplasmático granular fino
Sm	Granular Grueso
Sm/nRNP	Granular Grueso
SP100	Centriolar, citoplasmático reticular
SSA	Citoplasmático, Granular Fino, Citoplasmático Reticular, Granular Grueso, Nucleolar
SSB	Granular Fino, Citoplasmático Reticular
Ro52	Granular Fino, Citoplasmático Reticular, Granular Grueso
Scl70	Granular Fino

## DISCUSIÓN

La determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia o en fase sólida es una de las pruebas de laboratorio más solicitadas ante la sospecha clínica de enfermedad autoinmune, es así que el tamizaje de autoanticuerpos mediante FANA en el sustrato celular HEp-2 permite orientar el diagnóstico de un gran número de enfermedades autoinmunes, siendo necesario el uso de biomarcadores de laboratorio específicos para corroborar e diagnóstico de la enfermedad autoinmune. En el presente estudio se observa que el sexo femenino es el más afectado en un 89,0% de los casos (relación 9:1), la edad promedio de afección de la enfermedad fue de 42 años. Diversos estudios en otros grupos de enfermedad autoinmunes como el realizado por Jiménez y colaboradores en el 2014 (13) reportan que del 100% de los casos estudiados las mujeres correspondían al 62,5%; así mismo indicaron que la edad promedio fue de 53 años. En otro estudio, Pérez y colaboradores en el 2017 (14) determinaron que, de 319 casos estudiados, el 91% eran de sexo femenino e indicaron que la edad promedio fue de 41 años.

Al comparar los datos obtenidos entre los estudios se puede observar similitud entre ellos, corroborando que las enfermedades autoinmunes afectan con más frecuencia a mujeres en edad fértil y productiva de 15-45

años, la etiología no se conoce con exactitud, pero se cree que factores hormonales, genéticos y ambientales juegan un papel importante para que se desencadene la enfermedad, las hormonas femeninas por su parte juegan un rol importante en la maduración, activación y sobrevida de las células B, entre ellos los que tienen potencial autoreactivo, así mismo las hormonas influyen en la diferenciación de las células T reguladoras.

Se destaca que en el grupo de pacientes estudiados el 40% de las solicitudes de laboratorio no fueron acompañadas del diagnóstico presuntivo de la enfermedad. Así mismo, se observó que las enfermedades autoinmunes sistémicas frecuentemente fueron: Artritis Reumatoide (12,0%), Poliartritis (12,0%) y Lupus Eritematoso Sistémico (10%), Enfermedad de Tejido Conectivo (5,0%) y Fenómeno de Raynaud (5,0%) fueron las que frecuentemente se presentaron en las órdenes médicas. Al comparar los datos obtenidos, Kokuina y colaboradores en el 2016 (15) realizaron un estudio en 343 pacientes con enfermedades sistémicas autoinmunes determinando que entre las enfermedades más frecuentes se encontraban: Artritis Reumatoide (22,7%), Lupus Eritematoso Sistémico (19,5%), Tiroides Crónica (9,3%), Enfermedad de Graves (6,4%) y Esclerodermia (5,2%). La causa o desarrollo de las distintas enfermedades autoinmunes es inexacta y las diversas circunstancias hacen que el

diagnóstico de muchas de las enfermedades autoinmunes no pueda basarse en un único criterio causal, sino en múltiples criterios relacionados con la expresión de la enfermedad en sus diversas afectaciones, hecho que repercute en que el diagnóstico de la misma se realice de manera tardía.

Existen diferentes factores que pueden predisponer al desarrollo de enfermedad autoinmune, entre estos se acepta: género, edad, aspectos raciales, ambientales y hormonales. Los signos y síntomas varían de uno a otro paciente dificultando en muchos casos el diagnóstico clínico, los síntomas comúnmente reportados incluyen: síntomas musculares, cutáneos, oftalmológicos, alteraciones hematológicas, fiebre, síntomas vasculares, cardiopatías, neurológicos, nefrológicos, endocrinos y metabólicos. A este respecto, Jiménez y colaboradores en el año 2014 (13) demuestran que las enfermedades autoinmunes en particular el lupus eritematoso sistémico se presentan con signos y síntomas que varían ampliamente de una persona a otra, por lo cual diagnóstico diferencial del paciente es crucial para hacer un correcto diagnóstico de la enfermedad.

En referencia a los 100 pacientes estudiados el 21,0% presentó FANA positivo y el 26,0% presentó ANA-LIA positivo para las distintas enfermedades autoinmunes. Estos valores se correlacionan con los reportes de Ramam y colaboradores, quienes el 2017 (16) reportaron positividad por ambos métodos, en el 28,9% de las muestras estudiadas. Otro estudio similar realizado por Walker y colaboradores en el 2016 (17) en 321 muestras de suero de pacientes con distintas enfermedades autoinmunes, determinó que el 70,7% (227) fueron positivas por ANA IFI y ANA-LIA. Otro estudio realizado en India por Begum y colaboradores el 2018 (18) en 150 muestras, determinó que el 26,0% fueron positivas para ANA IFI y ANA-LIA en pacientes con enfermedades autoinmunes, siendo estos resultados similares a los encontrados en el presente estudio.

Los porcentaje de positividad de las pruebas de FANA y ANA-LIA obtenidos en los diferentes estudios pueden estar influenciados debido a criterios de selección de las muestras, prevalencia de las enfermedades autoinmunes en una determinada población o grupo racial, el origen de los estuches serológicos empleados ya que algunos estuches de ANA-LIA detectan 23 antígenos, 17 antígenos o 10 antígenos, siendo estos factores entre otros los que contribuyen a la variabilidad de los resultados que se encuentran en las diferentes publicaciones

científicas. Por otra parte, influye si el centro en donde se realiza el estudio emplea o no los criterios ICAP (International Consensus on Antinuclear Antibody) u otro para la asignación de los patrones fluorescentes.

Al evaluar los diferentes antígenos y la intensidad de la reacción de la prueba de ANA-LIA, se observó que el 27% de los pacientes presentó bandas con intensidad de una (+) a tres cruces (+++). Los antígenos que se presentaron con mayor frecuencia fueron: SS-A (8/27) DSF70 (5/27) y PM-Scl 75/100 (5/27). Al respecto, el 2018 Hansson y Ronnelid (10) estudiaron 20 pacientes con enfermedades autoinmunes, reportaron que el 30% de ellos fueron positivos para los antígenos RNP-70K, RNP-A, y RNP-C. Por otro lado, un estudio por Garg y colaboradores en el 2017 (19) evaluó mediante la técnica de ANA-LIA a 78 en pacientes que padecían distintas enfermedades autoinmunes y detectó que el 32,0% de las muestras fueron positivas para los antígenos SS-A, Jo-1 y ds DNA. El test multiplex de ANA-LIA frente a 22 antígenos recombinantes, contribuye a mejorar la especificidad diagnóstica y los valores o predictivos de los anticuerpos antinucleares contribuyendo a un diagnóstico más preciso de la enfermedad autoinmune.

En el presente estudio al relacionar los patrones observados con el resultado de la prueba de ANA (Tabla 3), se observó que el 79,0% de los casos tenían títulos negativos ( $\leq 1/80$ ). El 21,0% tenía títulos positivos  $\geq 1/160$ , observándose para este grupo de pacientes diversos patrones fluorescentes se presentan solos o acompañados de otros patrones fluorescentes, destacándose como los frecuentemente encontrados al Granular Grueso (23,8%), Nucleolar (19,0 %) y Granular Fino (14,2%). A este respecto, un estudio realizado por Oliva en el 2019 (20) quien, al revisar el historial clínico de 322 pacientes con enfermedades autoinmunes, reporta que mediante la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (FANA) se detectaron diversos patrones fluorescentes siendo los más frecuentes: Granular 135 (41,93%), Homogéneo 109 (33,85%), Centromérico 34 (10,56%), Citoplasmático 25 (7,76%) y Nucleolar 9 (2,80%), asociándose estos con las distintas enfermedades de tejido conectivo (18). Al comparar los resultados de estos estudios se observa que el patrón granular es frecuentemente encontrado en los pacientes con diagnóstico o sospecha de enfermedad autoinmune.

Con respecto al valor diagnóstico de FANA y ANA-LIA, se determinó que entre estas pruebas existía un porcentaje de concordancia del 82,0% con un índice

de Kappa de 0,51 “Moderado”, siendo los valores de sensibilidad del 71,4% y especificidad del 84,8. En un estudio similar Benítez y colaboradores en el 2011 (11) determinaron que la concordancia entre FANA y ANA-LIA fue del 68%. Al determinar la baja concordancia en el estudio, los autores identifican que, ante la presencia de un patrón positivo por FANA, no se confirma el diagnóstico de enfermedad autoinmune, siendo necesario realizar una prueba serológica además de la correlación con signos y síntomas del paciente para apoyar el diagnóstico clínico. Por su parte, Kavanaugh y colaboradores en el 2000 (21), afirman que la diferencia entre los resultados de sensibilidad y especificidad que se obtienen en este tipo de estudios, entre otros, se debe a que FANA detecta una gran variedad de antígenos nucleocitoplasmáticos, contrariamente al limitado número de antígenos presente en los test de ANA-LIA.

Cuando se asocia la presencia de antígenos ANA-LIA positivos frente a patrones fluorescentes positivos (tabla 5), se observa que la positividad del patrón Granular está asociada a la presencia de diferentes antígenos, como NRNP / SS-A, Sm, Sm/RNP, SSA y SSA /Ro52, por su parte, el Patrón Granular Fino mostró estar asociado a los antígenos DFS70, Nucleosoma y SSA /Ro52 / Scl70. Estos resultados permiten establecer que para un determinado patrón fluorescente puede haber positividad de más de un antígeno por la prueba de LIA y viceversa. Similar hallazgo fue reportado previamente por Sarojini Raman y colaboradores en el 2017 (16) quien evidenció asociación entre el patrón granular con antígenos ds DNA, histona, nucleosoma SSA, RNP/Sm, Ribosomal. La asociación entre el patrón fluorescente y antígeno ANA-LIA involucrado y en asociación con los signos y síntomas que presenta el paciente permite al

clínico establecer con mayor precisión la entidad autoinmune que afecta al paciente. (16) por otra parte permite conocer y asociar de manera más precisa la relación de los patrones fluorescentes con las enfermedades autoinmunes y los autoantígenos hacia los cuales están dirigidos los anticuerpos. Es necesario además realizar un estudio con un mayor tamaño muestral para establecer las posibles asociaciones entre los patrones fluorescentes y los autoantígenos con la entidad autoinmunes y las complicaciones orgánicas que los caracterizan.

FANA es el método de tamizaje aceptado en la práctica clínica para orientar el diagnóstico clínico de enfermedad autoinmune más probable. Sin embargo, debido a que un patrón fluorescente puede estar presente en una o más enfermedades autoinmunes, infecciones y enfermedades oncológicas, se requiere del apoyo de otros métodos de laboratorio que permitan identificar con mayor precisión los antígenos hacia los cuales están dirigidos los autoanticuerpos del paciente. ANA-LIA ha demostrado ser una herramienta de laboratorio costoefectiva que, al ser empleada en asociación con la prueba de FANA con un grado de correlación de resultados moderado, contribuye a mejorar la sensibilidad, especificidad, y los valores predictivos de la determinación de anticuerpos antinucleares que puede contribuir a un diagnóstico oportuno y preciso de enfermedades autoinmunes.

#### **Conflicto de intereses y financiación.**

Los autores declaran no tener conflictos de intereses. El trabajo de investigación fue financiado por los recursos de los Impuestos Directos Hidrocarburos (IDH).

---

### **Referencias**

1. Siachoque H., Valero O., Iglesias A. (2013) Tolerancia inmunológica, un recorrido en el tiempo: ¿cómo discriminar entre lo propio y lo extraño? *Rev. colomb reumatol.* 20(4) :237-249.
2. Palmezano M., Figueroa C., Rodríguez R., Plazas K. (2018) Prevalencia y caracterización de las enfermedades autoinmunitarias en pacientes mayores de 13 años en un hospital de Colombia. *Med Int Méx.* ;34(4):522-535.
3. Ganapathy S., Vedam V., Rajeev V., Arunachalam R. (2017) Autoimmune Disorders Immunopathogenesis and Potential Therapies. *J Young Pharm.*; 9(1): 14-22.
4. S.A La prevalencia de lupus es entre 5 y 10 veces mayor en población de raza negra: Los días 21 y 22 de septiembre se ha celebrado en Madrid el X Curso LES y SAF, organizado por la SER, con la colaboración de GSK. Sep. 2018
5. Sharmin S., Ahmed S., Abu Saleh A., Rahman F., Choudhury MR., Hassan MM. (2014) Association of Immunofluorescence pattern of Antinuclear Antibody with Specific Autoantibodies in the Bangladeshi Population. *Bangladesh Med Res Counc.; Bull* 2014; 40: 74-78.

6. Mahler M., Meroni P., Bssuyt X., Fritzler M. (2014) Current concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as Anti-Nuclear antibodies. *J Immunol Res*; 315179.
7. Eissfeller P., Sticherling M., Scholz D., Hennig K., Luttich T, Motz M. (2014). Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. *Ann N Y Acad Sci*; 1050(1), 327-339.
8. Álvarez-Razo S., Vallejo-Rosero K. (2017) Prevalencia de enfermedades sistémicas en pacientes sometidos a extracciones simples. *Dom. Cien*; 3(3), 470-486.
9. Jeong S., Hwang H., Roh J., Eun Shim J., Kim J., Geun Tae K., Hee Sang T., Hyon Suk K. (2018) Evaluation of an Automated Screening Assay, Compared to Indirect Immunofluorescence, an Extractable Nuclear Antigen Assay, and a Line Immunoassay in a Large Cohort of Asian Patients with Antinuclear Antibody Associated Rheumatoid Diseases: A Multicenter Retrospective Study. *J Immunol Res*; 2018:9094217.
10. Hansson H., Ronnelid J. (2010) Detection of antinuclear antibodies by the Inno-Lia ANA update test in canine systemic rheumatic disease. *Vet Clin Pathol*; 39(2): 215–220. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2009.00193.x>
11. Benítez P., Rincon L., Quintero JC., Aristizábal H. (2011) Concordance between antinuclear antibody determination by immunofluorescence and line immunoassay. *Medicina & Laboratorio*; 17(09-10):429-443.
12. Mendez T., Ochoa L., Posso I., Ortiz E., Naranjo J., Tobón G. (2018) Interpretación de los autoanticuerpos en enfermedades reumatológicas. *Rev Colomb Reumatol*; 25 (2): 112-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rcreu.2018.02.004>.
13. Jiménez J., Águila F., Santiago C., Ramos JL., Vargas JA., Navarrete N., Zamora M., Sabio JM., Jáimez L. (2014) Diagnóstico diferencial del lupus eritematoso sistémico: Aspectos claves del día a día. *Actual Med*; 99(792), 104-106.
14. Pérez C., Losans R., Viraldell M. (2017) Enfermedades Autoinmunes Sistémicas: Forma de presentación, evolución y supervivencia en pacientes con Esclerosis Sistémica en pacientes con Síndrome de Sjögren. Tesis doctoral. Pp. 138-145
15. Kokuina E., Chico A., Estévez M., Argüelles A., Casas N., Pérez D., Infante A., Velbes P., Pérez R. (2016) Autoanticuerpos diagnósticos en enfermedades autoinmunes sistémicas y específicas de órgano *Rev cubana med*. 45(2)
16. Raman S., Raman A., Amit., Pradhan., Prasant., Dash, Kanaklata., Senapati., Urmila. (2017) Correlation of Indirect Immunofluorescence & Line Immunoassay Method in Detection of Autoimmune Diseases: an Observational Study at a Tertiary Care Teaching Hospital. *Sch J App Med Sci*; 5(7A):2520-2526.
17. Walker R., Kumar Y., Saikia B., Anand S., Varma S., Singh S. (2016) Use of panel testing for detection of antinuclear antibody in a resource-limited setting: an appraisal. *Postgrad Med*, 128(8), 869–874. <https://doi.org/10.1080/00325481.2016.1220808>
18. Begum J., Shailaja V., Ümit Türsen MD. (2018) Detection of Sensitivity and Specificity of Line Immuno Assay in Comparison with Indirect Immunofluorescence Assay for the Detection of Anti-Nuclear Antibodies in Diagnosis of Systemic Autoimmune Disorders. *Int J Curr Microbiol App Sci*; 7(11): 743-748
19. Garg S., Srivastava A., Santosh P. (2017) Correlation of Line Immuno Assay with Indirect Immunofluorescence Assay for the Detection of Anti-Nuclear Antibodies in Various Autoimmune Disorders *Autoimmune Disorders. J Autoimmune Disord*; 3(3): 37
20. Oliva JE., Arroyo JL., Oliva J., García MA. (2019) Patrones de tinción de anticuerpos antinucleares identificados por Inmunofluorescencia indirecta en pacientes con enfermedad del tejido conectivo. *Rev Med Hered* ; 30:33-39. DOI: <https://doi.org/10.20453/rmh.v30i1.3470>
21. Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon DH., Hamburger HA. (2000) Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med*; 124:71-81.