

INVESTIGACIÓN ORIGINAL

# Capacidad de las células Hep-2, Hep-2000® Inmunofluorescencia y Hep-2000® Colorzyme, en la determinación de ANAS y SSA/Ro en la evaluación inicial en pacientes con Enfermedad del Tejido Conectivo no Diferenciada

Viviana Gutiérrez<sup>1</sup>, María C. Romero<sup>2</sup>, Oscar J. Felipe<sup>3</sup>, Ana María Santos<sup>4</sup>,  
Rafael Valle O.<sup>5</sup>, John Londoño<sup>6</sup>

## Resumen

**Introducción:** la presencia de anticuerpos antinucleares (ANAS) ha sido tradicionalmente asociada a enfermedades del tejido conectivo; su determinación se constituye en una importante herramienta en el diagnóstico de estas entidades.

Para su evaluación, se han utilizado métodos de inmunofluorescencia (IFI) que emplean como sustrato las células Hep-2. En los últimos años, se han generado nuevos sustratos celulares a partir de la manipulación genética de las iniciales denominados Hep-2000®. Estas permiten la identificación del antígeno Ro de manera simultá-

nea. La incorporación reciente de métodos enzimáticos para la lectura de la prueba, ha generado una nueva técnica llamada Colorzyme que permite el uso del microscopio de luz, constituyéndose en una alternativa económica y funcional en comparación con la IFI convencional.

**Objetivo:** el presente estudio pretende establecer la capacidad para detectar ANAS en los sustratos: Hep-2 y Hep-2000® por las técnicas de IFI y Colorzyme, en un grupo de pacientes con Enfermedad del Tejido Conectivo no Diferenciada (ETCND). Adicionalmente comparó la detección del antígeno Ro en los sustratos Hep-2000® con los resultados obtenidos por la técnica de ENAS ELISA tradicional.

**Materiales y métodos:** se analizaron 26 pacientes con ETCND a quienes se les determinó ANAS por las técnicas: Hep-2 IFI; Hep-2000® IFI; Hep-2000 Colorzyme y ENAS por ELISA Screening (con especificidad para los autoantígenos Sm, RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70 y Jo-1).

1 Bacteriología. Facultad de Ciencias de Salud. Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

2 Bacteriología. Magíster en Microbiología (Inmunología). Servicio de Reumatología Hospital Militar Central. Universidad Militar Nueva Granada.

3 Medicina Interna y Residente de Reumatología, Hospital Militar Central, Universidad Militar Nueva Granada.

4 Bacterióloga. Especialista en Epidemiología. Coordinador Administrativo de la Unidad de Farmacología Clínica, Universidad de La Sabana.

5 Medicina Interna y Reumatología, Jefe del Servicio de Reumatología e Inmunología Clínica, Hospital Militar Central, Universidad Militar Nueva Granada. Director Científico Salud Reinun.

6 MD, MSC. Medicina Interna y Reumatología. Maestría en Ciencias Médicas. Clínica Universitaria TELETÓN. Director de Postgrados Facultad de Medicina. Universidad de La Sabana.

Recibido para publicación: enero 31/2007

Aceptado en forma revisada: febrero 28/2007

**Resultados:** los resultados encontrados por las técnicas revelan un mayor rendimiento diagnóstico (ANAS positivos) en las células Hep-2000®: 23 (88%) por IFI y 21 (81%) Colorzyme, comparadas con 20 (76%) del sustrato Hep-2 IFI. Todos los patrones “clásicos” IFI estuvieron representados en la técnica de Hep-2 IFI; en la técnica de Hep-2000® IFI no se observó el patrón homogéneo, por Colorzyme no se observaron los patrones nucleolar ni el citoplasmático. En todas las técnicas la forma predominante de presentación fue el patrón moteado fino: 50% Colorzyme, 42,9 % para Hep-2000® IFI y 34,6% para Hep-2 IFI. En general se obtuvieron buenas correlaciones en los resultados entre las técnicas Hep-2000® IFI y la enzimática ( $r=0,74$   $p<0,000$ ) con una concordancia 0,71 (Cohen K,  $p<0,000$ ), mas no así con Hep-2 que fue de 0,21 ( $p<0,03$ ). Las correlaciones entre los patrones de IFI ( $r=0,6$   $p<0,000$ ) y las diluciones ( $r=0,75$   $p<0,000$ ) fueron mejores entre los sustratos Hep-2000®, comparadas con las células Hep-2 ( $r=0,5$   $p<0,003$ ). Para establecer la capacidad de identificación del autoantígeno Ro de las técnicas Hep-2000®, se compararon los resultados obtenidos con los de la técnica específica de ELISA para SSA-Ro. Las células Hep-2000® mostraron una sensibilidad del 66% por IFI y del 33% Colorzyme.

**Conclusiones:** la utilización de células Hep-2 sigue siendo una buena alternativa para la determinación de ANAS. Sin embargo, las células Hep-2000® pueden considerarse un sustrato útil y confiable en nuestro medio, tanto por color como IFI. La técnica por color facilita su realización al abolir el uso de IFI, recurso tecnológico escaso en muchas instituciones. Los resultados negativos para Ro deben ser interpretados con cautela pacientes con ETCND, en algunos de estos casos es posible se requiera de la confirmación por otros métodos.

**Palabras clave:** ANAS, SSA/Ro, inmunofluorescencia, Hep-2000, Hep-2, Enfermedad del tejido conectivo no diferenciada.

### Summary

**Introduction:** The presence of antinuclear antibodies (ANAS) has been traditionally associated to connective tissue diseases. and their

determination is an important tool in the diagnose of these entities.

In the last years the Cells Hep-2 has been used in the Immunofluorescencia technique (IFI). New cellular sustratos has been generated by genetic manipulation, denominated Hep-2000®. These allow the identification of the antigen Ro in the same procedure. The recent incorporation of enzymatic methods for the reading of the test, has generated a new technique called Colorzyme, This allows the use of the microscope of light that become the procedure in an economical and functional alternative in comparison with the conventional IFI.

**Objective:** The present study pretend to establish the capacity of detection of ANAS in sustratos: Hep-2 and Hep-2000® for IFI and Colorzyme, in a group of patients with No Differentiated Conective Tissue Disease (NDCTD). Additionally compares the detection of the antigen Ro in Hep-2000® cells and confront the results obtained by the ENAS-ELISA technique .

**Materials and methods:** The presence of ANAS were analyzed in the serum of 26 patients with NDCTD by the techniques: Hep-2 IFI; Hep-2000® IFI; Hep-2000 Colorzyme® and ENAS for ELISA Screening (with specificity for the auto antigens Sm, RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70 and Jo-1).

**Results:** Hep-2000®: demonstrated a better capacity in order to found ANAS: 23 (88%) for IFI and 21 (81%) for Colorzyme, compared with 20 (76%) of Hep-2 IFI. All the patterns «classic» IFI was represented in the Hep-2 cells IFI; Hep-2000 IFI the homogeneous pattern was not observed. In Colozyme tecnica the nucleolar and cytoplasmic patron was not observed. In all the techniques the predominant form of presentation was the speckle-fine pattern: 50% Colorzyme, 42.9% for Hep-2000® IFI and 34.6% for Hep-2 IFI Good correlations were obtained in the results among the technique Hep-2000® IFI and the Colorzyme ( $r=0.74$   $p<0.000$ ) but not in the Hep-2 IFI substrate: 0.21 ( $p<0.03$ ). The correlations among the patterns of IFI ( $r=0.6$   $p<0.000$ ) and the dilutions ( $r=0.75$   $p<0.000$ ) were better among the Hep-2000® substrates, compared with the Hep-

**2 cells ( $r=0.5 <p0.003$ ). to establish the capacity of identification of the Ro antigen by Hep-2000®, results were compared with those obtained by ELISA specific for SSA-Ro. The Hep-2000® cells showed a sensibility of 66% by IFI and 33% by Colorzyme.**

**Conclusions: The use of Hep-2 cells are a good alternative for the determination of ANAS. However, Hep-2000® cells can be considered an useful and reliable substrate in Colombia. The Colorzyme abolish the use of IFI microscope, -an expensive and sophisticated instrument-. However the negative results for Ro in this substrate do not discarded the presence of antigens in this group of patients.**

**Key words: ANAS, SSA/Ro, Immunofluorescence, Hep-2000, Hep-2, Undifferentiated connective tissue disease.**

## Introducción

En la práctica diaria muchos laboratorios clínicos utilizan como sustrato para la determinación de ANAS la línea celular de carcinoma de células escamosas de esófago humanas llamadas Hep-2 mediante la técnica de inmunofluorescencia, apoyados en la evidencia de la mayor sensibilidad de esta línea celular, comparada con otros sustratos como los obtenidos de cortes de tejidos de riñón de roedor u otras cepas celulares en los que la sensibilidad varía significativamente entre 67 y 88%<sup>1-4</sup>. Sin embargo, los resultados al utilizar el sustrato Hep-2 resultan difíciles de comparar debido a la falta de estandarización internacional de las condiciones de cultivo, fijación y secado<sup>3,5</sup>. Adicionalmente, existen otras dificultades que complican su interpretación. Una de ellas está en la imposibilidad de identificar el antígeno específico contra el cual está reaccionando el autoanticuerpo y para su confirmación se hace necesario el uso de otras técnicas como son: el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima (ELISA), la Inmunoprecipitación en agar, el Inmunoblotting, la Contrainmuno-electroforesis entre otras. Otro problema está en relación con los resultados de ANAS negativos o débilmente positivos que frecuentemente se producen con los sueros de pacientes que contienen anticuerpos anti-SS-A/Ro. Es posible que esta

sea la justificación para la existencia de reportes frecuentes de “ANAS negativos en pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES)”. La incapacidad de las células Hep-2 para la detección de anticuerpos anti-SS-A/Ro generalmente es debida a la baja concentración del antígeno y la variabilidad de su expresión en diferentes lotes de células.

En los últimos años han surgido alternativas en la determinación de ANAS, como es el caso de las células Hep-2000®, las cuales están constituidas por células Hep-2 transfectadas con el antígeno Ro de 60 KDa, confiriendo así una mayor expresión antigénica, con la posibilidad adicional de detectar semicuantitativamente la presencia de anticuerpos contra el sistema SSA/Ro.

Cuando se utiliza este sustrato existe la posibilidad de su lectura mediante el microscopio de fluorescencia o el de luz convencional dependiendo del conjugado (anticuerpo anti-inmunoglobulina humana marcado) que se utilice. En la técnica de IFI, el conjugado está marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) como fluorocromo visible con luz UV en el microscopio de fluorescencia. La otra Técnica, denominada Colorzyme, utiliza un conjugado marcado con peroxidasa de rábano picante (color) la cual emplea para su detección la lectura luz visible, lo que permite la utilización de un microscopio óptico estándar. Esta última técnica hace más accesible la realización de la prueba en la mayoría de laboratorios clínicos convencionales, ya que no se requiere el uso del microscopio de IFI, que se constituye como un recurso de alta complejidad y costoso, especialmente en los países como el nuestro en vías de desarrollo.

Desde la comercialización del sustrato Hep-2000®, muchos laboratorios están evaluando las propiedades de éste para la detección de anticuerpos anti SS-A/Ro. Publicaciones previas muestran una sensibilidad mayor (80-100%), similares a los resultados obtenidos por técnicas como la contrainmuno-electroforesis, la inmunodifusión y ELISA<sup>2, 3, 5-7</sup>.

El presente estudio comparó la capacidad para detectar la presencia de ANAS positivos en un grupo de pacientes colombianos con ETCND, de los sustratos: Hep-2 y Hep-2000® por las técnicas de IFI y enzimático-Colorzyme. Adicionalmente com-

paró la capacidad para la identificación del antígeno Ro en los sustratos Hep-2000®, con la técnica convencional de ELISA para la identificación de los ENAS (Anti-extractable nuclear antigen antibodies).

## Materiales y métodos

Se realizó un estudio prospectivo en un grupo de pacientes que consultaron al Servicio de Reumatología e Inmunología Clínica del Hospital Militar Central entre abril de 2004 y abril del 2005. Se seleccionaron 26 pacientes con ETCND acorde con las recomendaciones hechas por Alarcón S.G.<sup>8,9</sup>. Se incluyeron pacientes que presentaron al menos una de las siguientes manifestaciones: artralgias o artritis simétrica, fenómeno de Raynaud, fotosensibilidad, complejo sicca, pérdida del cabello, úlceras orales, cefalea recurrente, síntomas constitucionales, xeroftalmia, xerostomía, xerodermia, neuropatía periférica, livedo reticularis, adenopatías, pericarditis, Pleuritis y rash. Además aquellos pacientes con alteraciones en el laboratorio previas, como la presencia de ANAS positivos, ENAS, Anticuerpos anticardiolipinas (ACAS), Factor reumatoide, VDRL falso positivo. Se descartaron aquellos pacientes que presentaron al ingreso al estudio: con Anti-DNA positivo, consumo del complemento, otras causas primarias de enfermedad relacionadas con fenómenos de autoinmunidad o que cumplieron criterios para una enfermedad del tejido conectivo, de acuerdo a lo propuesto por el American College of Rheumatology (ACR)<sup>10-13</sup>.

Todos los ensayos para la detención de los ANAS se realizaron por triplicado, previa estandarización acorde a las instrucciones de manufactura. Las lecturas fueron realizadas por dos observadores expertos, ciegos a la información clínica de los pacientes.

### Técnica de ANAS Hep-2000 IFI y Hep-2 IFI

Se utilizó el sistema de células epitelioides humanas transfectadas con SSA/Ro, fijadas con formalina (en etanol) (Hep - 2000® *Inmuno concepts, Inc. Sacramento, CA*) y el sustrato de células Hep-2 (*Inmuno Concepts, Inc. Sacramento, CA*). Los sueros fueron incubados previa dilución 1:80 (punto de corte) por 30 minutos a

temperatura ambiente en cámara húmeda, luego las placas fueron lavadas por 10 minutos con tampón PBS (pH 7,2) para remover las uniones inespecíficas, luego se incubaron por 30 minutos en las mismas condiciones con el conjugado (inmunoglobulina IgG de cabra antihumana cadenas pesadas y ligeras marcado con FITC)<sup>14</sup>. Posteriormente se realizaron tres lavados, el último por 10 minutos con azul de Evans como medio de contraste. Las placas fueron examinadas bajo un microscopio de fluorescencia (Nikon LABOPHOT FX-33W). Las muestras que presentaron fluorescencia fueron tituladas hasta el punto final (diluciones seriadas con base dos) 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 y 1:1280, además clasificadas acorde a los patrones de fluorescencia. Las muestras que presentaron fluorescencia citoplasmática con un único patrón discernible fueron consideradas positivas. Las muestras que presentaron una reacción positiva de coloración moteada con coloración prominente del nucleolo en 10-20% de la interfase nucleica brillante y la región cromosómica negativa, se consideraron positivas para SS-A /Ro.

Para establecer la presencia del antígeno Ro, y comparar los resultados, a todas las muestras se les practicó la prueba de *ELISA Screening* para ENAS<sup>15</sup> con especificidad para los autoantígenos Sm, RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70 y Jo-1 (*RELISA ENA Single Well Screening Kit, Inmuno concepts, INC*) y cuantificación individual de SS-A/Ro, SS-B/La, Sm y RNP (*ELISA ENAS SS-A, SS-B, Sm y RNP Sera Quest INC*).

### Técnica para ANAS con células Hep-2000® Colorzyme

El sistema de análisis de ANA-Ro Hep-2000® Colorzyme (*Inmuno Concepts, Inc. Sacramento, CA*), utiliza la técnica indirecta de anticuerpos enzimáticos (punto de corte  $\geq$  1:40 diluciones). Las muestras de suero en diluciones de 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 y 1:1280 se incubaron con el sustrato por 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Luego del lavado por 10 minutos para retirar los anticuerpos que no se unieron, se adiciona el conjugado (anti-inmunoglobulina humana IgG marcada con color). Tras el último lavado finalmente se sometió a incubación bajo las mismas condiciones

anteriores de tiempo y temperatura con el reactivo de color Colorzyme® que contiene un sustrato específico de la enzima (4-cloro 1-naftol). La reacción entre el anticuerpo marcado con la enzima y el sustrato específico de la misma se evidenció por una reacción visible en el portaobjetos con un microscopio óptico estándar. En las muestras positivas los núcleos celulares se tiñeron de azul-púrpura, con un patrón de tinción característico de la particular distribución del antígeno nuclear en las células.

### Análisis estadístico

Paquete estadístico: SAS 9.1 SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Para el análisis descriptivo utilizando promedios, medianas, desviación estándar para variables continuas y distribución de frecuencias para variables categóricas. Diferencias en las tres técnicas ANAS con base en los títulos se analizaron por Wilcoxon Sign Rank Test con una significancia menos de 0,05. Para asociaciones bivariadas entre los patrones de las tres técnicas se utilizaron pruebas de Correlación de Pearson,  $k$  de Cohen. Las comparaciones fueron hechas por ANOVA y CHI-CUADRADO (no paramétricas).

### Implicaciones éticas

Este trabajo respetó las consideraciones éticas para la investigación en humanos, contenidas en la declaración de la Asamblea de la Asociación Médica Mundial en Helsinki en 1964, así como sus revisiones posteriores hasta el 2000. Contó con la aprobación del comité de ética del Hospital Militar. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado.

## Resultados

### Características generales de la población

Se estudiaron 26 mujeres, de raza mestiza 24 (92,3%) y 2 (7,7%) de raza blanca con un rango de edad de 24-64 años con un promedio de  $39,5 \pm 12,3$  años. La edad al inicio de los síntomas fue de  $34,7 \pm 13,8$  años y el tiempo de evolución entre el inicio de los síntomas y la fecha de evaluación fue de  $2,6 \pm 2,3$  años. (Tabla 1).

Las principales características clínicas de las pacientes fueron: compromiso articular 80,8%, fenómeno de Raynaud en el 65,4%, fotosensibilidad (38,5%), sín-

**Tabla 1. Características generales de la población.**

Características	N (%)
Población	26
Sexo M	26
Edad - años (X $\pm$ DS)	$39,5 \pm 12,3$
Edad al inicio de los síntomas (X $\pm$ DS)	$34,7 \pm 13,8$
T. evolución - años (X $\pm$ DS)	$2,6 \pm 2,3$
Raza	
Mestiza	31 (88,5)
Blanca	2 (5,7)
Negra	1 (2,9)
Escolaridad - años (X $\pm$ DS)	$10,2 \pm 3,6$
Casados	20 (74,0)

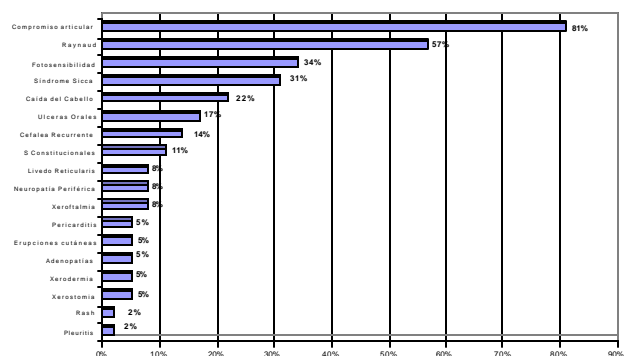
drome sicca (34,6%), fibromialgia (30,8%), alopecia (23,1%), xeroftalmia, úlceras orales y cefalea cada uno en el 11,5% (Figura 1).

Las características más importantes relacionadas con las manifestaciones articulares en la población estudiada fueron: el compromiso articular simétrico en 22 (84,6%), 21 con artralgias (80,8%), 17 con artritis (65,4%), con localización principalmente en pequeñas articulaciones: MTC (MCF) e interfalángicas proximales (IFP) 57,7% de las manos, carpos en 38,5% y rodillas 30,8%. (Tabla 2).

### Resultados de laboratorio

#### ANAS Hep-2 IFI

Veinte (76,9%) de 26 muestras analizadas fueron positivas para ANAS con células Hep-2 IFI. La distribución de los patrones en estos pacientes fue: moteado fino, 9 (34,6%); moteado grueso, 3 (11,5); centrómero y huso mitótico, 2 (7,7%), y



**Figura 1. Manifestaciones clínicas más frecuentes.**

**Tabla 2. Manifestaciones articulares.**

Manifestación	N (%)
Compromiso articular simétrico	21(80,8)
Artralgias	21(80,8)
Artritis	17 (65,4)
Tipo de Articulación	
MCF-IFP	15 (57,7)
Carpos	10 (38,5)
Rodillas	8 (30,8)
Tobillos	6 (23)
Codos	3 (11,4)

homogéneo, nucleolar, patrón mixto, citoplasma, 1 (3,8%).

#### **ANAS Hep-2000® IFI**

Al utilizar la técnica de células Hep-2000® ANAS/Ro IFI (*Inmuno Concepts, Inc. Sacramento, CA*)<sup>3, 5</sup>, 23 (88,5%) de 26 muestras analizadas fueron ANAS positivas. La distribución de los patrones en estos pacientes fue: 11 (42,3%) moteado fino, 3 (11,5%) patrón mixto (presencia de más un patrón simultáneamente), en la misma proporción 2 (7,7%) nucleolar, centrómero, huso mitótico y moteado Ro.

#### **ANAS Hep 2000® Colorzyme**

Con el sustrato Hep-2000® Colorzyme, 21 (80,8%) de las 26 muestras analizadas fueron ANAS positivas. La distribución de los patrones en estos pacientes fue: 13 (50,0%) moteado fino, 2 (7,7%) centrómero y huso mitótico y 1 (3,8%) homogéneo, moteado grueso, moteado Ro y citoplasmático en la misma proporción.

#### **Comparación de resultados de las tres técnicas**

De los 23 pacientes analizados, 18 tuvieron resultados positivos y tres fueron negativos de manera coincidente por las tres técnicas. Cuando se revisaron los expedientes de los tres pacientes negativos, se encontró: Paciente No. 5: mujer de 64 años que tuvo artralgias de las manos, sin otra evidencia de alteración de origen inmunológico. Paciente No. 26: mujer de 24 años de edad con un resultado previo de ANAS positivos a títulos bajos sin alteración adicional que pudiera relacionarse con un posible origen inmunológico y la Paciente No.

29: mujer de 24 años, al revisar la historia no se encontró evidencia real de ninguna alteración previa de origen inmunológico. Por lo anterior podemos considerar la técnica de Hep-2000® IFI con el patrón de comparación de las otras dos técnicas estudiadas: la sensibilidad para detectar de ANAS fue del 91% para Hep-2000® Colorzyme y de 86% para Hep-2 IFI.

Por la técnica de ANAS Hep-2000® Colorzyme, adicionalmente dos pacientes fueron negativos y correspondieron a la Paciente No. 19: mujer de 54 años con fenómeno de Raynaud positivo y artritis simétricas de las articulaciones MTC y la Paciente No. 9: mujer de 38 años con artralgias simétricas de las articulaciones del carpo, las MTC y de los codos, con factor reumatoide positivo a títulos bajos (16 Uds/dl) y resultado positivo para SSA/Ro por la técnica de ANAS Hep-2000® IFI y por ENAS ELISA. De manera coincidente estas dos pacientes tuvieron resultados positivos para ANAS por los otros dos métodos.

Por la técnica de ANAS Hep-2 IFI, tres pacientes más fueron negativos y correspondieron a: Paciente No. 24: mujer de 57 años de edad con artritis, artralgias simétricas de las articulaciones MCF, Fenómeno de Raynaud, Síndrome Sicca, fotosensibilidad y fibromialgia; la Paciente No. 22: mujer de 24 años de edad, artritis simétricas en los carpos positiva, caída del cabello y síntomas constitucionales y la Paciente No. 21: mujer de 25 años de edad, artritis y artralgias simétricas de las manos, fotosensibilidad, fibromialgia y VSG aumentada. Igual que por la técnica anterior tuvieron resultados positivos por los otros dos métodos (Tabla 3).

#### **Comparación de los patrones de tinción por las tres técnicas**

La forma más común de presentación por los tres métodos correspondió al moteado fino, con un porcentaje de resultados que osciló entre el 35 y el 50% de las muestras. Al comparar los resultados no se hallaron diferencias estadísticamente significativas Wilcoxon Sign Rank Test (Tabla 4).

Al comparar los resultados de los títulos obtenidos en las tres técnicas, no se observaron diferencias significativas entre las tres técnicas. Otras comparaciones no mostraron diferencia (Wilcoxon Sign Rank Test) (Figura 2).

**Tabla 3.** Comparación de resultados de las tres técnicas.

		Hep-2000 COLOR		Hep-2 IFI	
		Positivo (21)	Negativo (5)	Positivo (20)	Negativo (6)
Hep-2000 IFI	Positivos (23)	21 (91%)	2 (pac.19,9)	20 (86%)	3 (pac. 24,22,21)
	Negativos (3)		3 (pac. 5,26,29)		3 (pac.5,26,29)

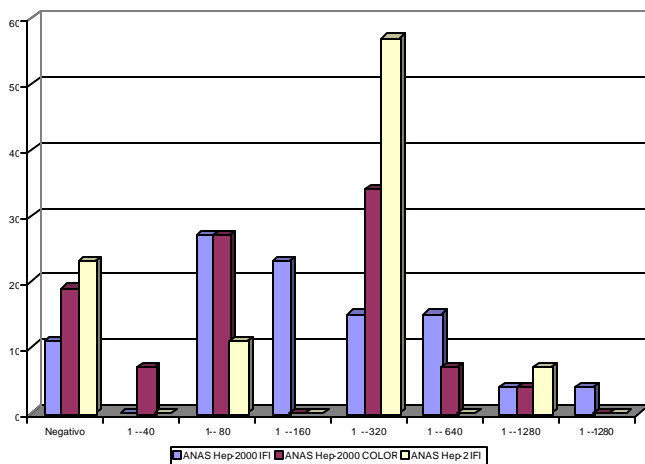
Positivos por las tres técnicas 18 pacientes.  
Negativos por los tres métodos 3 pacientes.

**Tabla 4.** Patrones de tinción obtenidos por cada técnica.

Patrón	Hep-2000 IFI N (%)	Hep-2 IFI N (%)	Hep-2000 COLOR N (%)
<b>Negativos n/26 (%)</b>	3 (11,5)	6 (23)	5 (19,2)
<b>Positivos n/26 (%)</b>	23 (88,5)	20 (77)	21 (81,8)
Homogéneo		1 (3,8)	1 (3,8)
Moteado fino	11 (42,3)	9 (34,6)	13 (50)
Moteado grueso	1 (3,8)	3 (11,5)	1 (3,8)
Nucleolar	2 (7,7)	1 (3,8)	
Centrómero	2 (7,7)	2 (7,7)	2 (7,7)
Huso mitótico	2 (7,7)	2 (7,7)	2 (7,7)
Moteado Ro	2 (7,7)		1 (7,7)
Patrón mixto*	3 (11,5)	1 (3,8)	1 (3,8)
Citoplasmático		1 (3,8)	

$p=0,247$

\* Se toma como patrón Mixto la presencia de más de un patrón simultáneo: moteado fino y citoplasmático en un individuo, homogéneo y periférico en 3 individuos de los 4 individuos.

**Figura 2.** Distribución porcentual de títulos en las muestras positivas por las tres técnicas.

Cuando se estableció la correlación entre las tres técnicas, mediante el análisis bivariado utilizando la correlación de Pearson, se encontró una muy buena correlación entre las dos técnicas que utilizaron Hep-2000® ( $r: 0,74$ ), mas no así cuando se realizó con los resultados obtenidos por Hep-2 IFI. De igual manera al establecer la concordancia entre los resultados positivos obtenidos por las tres técnicas, sólo se obtuvieron buenos resultados entre las que utilizaron Hep-2000® Tabla 5.

#### Detección de Antígenos Nucleares Extractables totales (ENAS) y Anticuerpos SSA-Ro

Las 26 muestras fueron evaluadas para la detección de antígenos nucleares extractables ENAS por técnica de ELISA screening (*RELISA ENA Single Well*

**Tabla 5.** Análisis bivariado de las tres técnicas empleadas.

	Hep-2 IFI	Hep-2000 IFI
Correlación de resultados (Pearson)		
Hep-2 IFI		
Hep-2000 IFI	0,66*	
Hep-2000 color	0,43*	0,74*
Concordancias de resultados (Cohen k)		
Hep-2 IFI		
Hep-2000 IFI	0,19*	
Hep-2000 color	0,21*	0,71*
Correlación de los patrones (Pearson)		
Hep-2 IFI		
Hep-2000 IFI	0,50*	
Hep-2000 color	0,34*	0,60*
Correlación de las diluciones (Pearson)		
Hep-2 IFI		
Hep-2000 IFI	0,70*	
Hep-2000 color	0,50*	0,75*

\* P&lt;0,05

Screening Kit, Inmuno concepts, INC) para los autoantígenos Sm, RNP, SS-A/Ro, SS-B/La, Scl-70 y Jo-1. Tres (11,5%) de las muestras analizadas fueron positivas y dos (7,7%) estuvieron dentro de la

zona gris. Estas cinco muestras fueron sometidas a confirmación por ELISA individual para la identificación del autoantígeno presente (*ELISA ENAS Sera Quest INC*). tres muestras fueron positivas para autoantígenos SSA/Ro. Los otros autoantígenos encontrados fueron: RNP, dos (25%) positivos y dos dentro de la zona gris 2; Sm, uno (25%) positivo. Las muestras fueron negativas para el resto de autoantígenos (Tabla 6).

#### Comparación en la detección de antígenos SSA/Ro

Para establecer la capacidad de identificación del auto antígeno Ro de las técnicas evaluadas (células Hep-2000® IFI y Hep-2000® Colorzyme) se compararon los resultados con las tres muestras previamente positivas para SSA/Ro por ELISA ENAS. La sensibilidad de la técnica Hep-2000® IFI fue del 66% (2) y 33% (1) para Hep-2000® Colorzyme. Sólo una fue positiva por las dos técnicas evaluadas. Los dos pacientes que tuvieron resultados en zona gris por la prueba de ENAS ELISA fueron negativos por los dos métodos (Figuras 3 y 4).

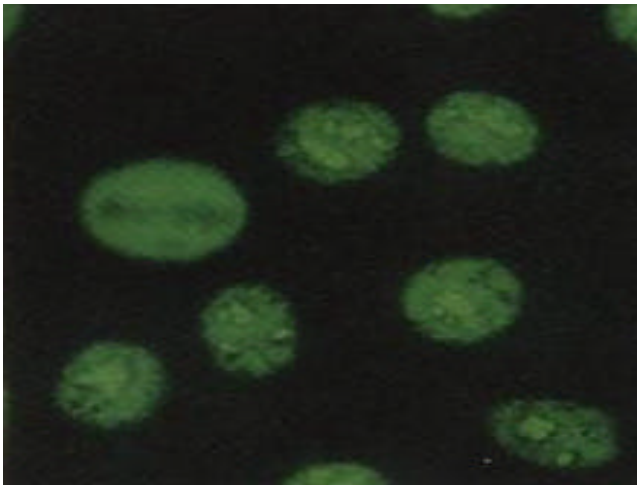
#### Correlaciones con los hallazgos clínicos

Para establecer la relación existente entre los principales hallazgos clínicos y los resultados de laboratorios, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Las únicas relaciones bivariadas que tuvieron diferencia estadística fueron: el fenómeno de Raynaud, el compromiso articular y la fotosensibilidad, con los resultados de ANAS Hep-2000®. No se encontró ninguna asociación del resultado positivo por Hep-2 y los hallazgos clínicos. (Tabla 7).

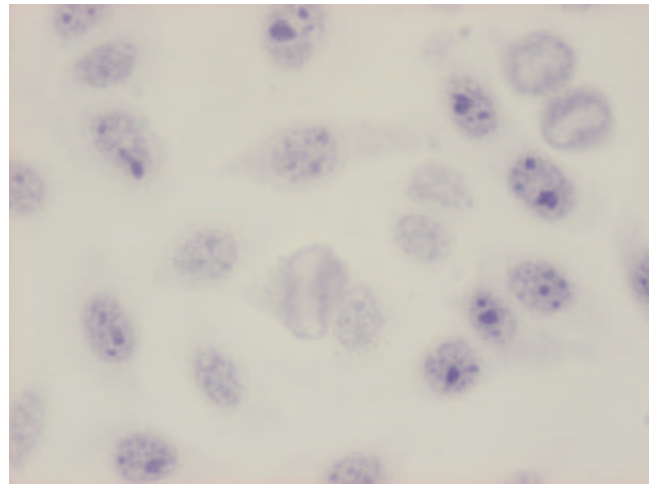
**Tabla 6.** Detección de antígenos nucleares extractables.

Anti-La (%)	ENAS	Anti-Ro (%)	Anti-RNP (%)	Anti-Sm (%)
—	Positivo	3(37,5)	2(25,0)	2(25,0)
8(100,0)	Negativo	3(37,5)	4(50,0)	6(75,0)
—	Zona Gris	2(25,0)	2(25,0)	—
8(100,0)	Total	8(100,0)	8(100,0)	8(100,0)

\* 1 paciente con Ro positivo y 2 con Ro dentro de la zona gris, mostraron tener otros autoantígenos presentes.



**Figura 3.** Inmunofluorescencia Indirecta. 100x tinción característica nucleolar de células Hep 2000 transfectadas con Ag Ro. Autorizado por immunoconcepts.



**Figura 4.** Colorzyme. 100x tinción característica nucleolar de células Hep 2000 transfectadas con Ag Ro. Autorizado por immunoconcepts.

**Tabla 7.** Correlación de los resultados de laboratorio y los hallazgos clínicos.

	Hep-2000 IFI	Hep-2000 color	Hep-2 IFI
F. Raynaud	0,50*	0,47*	0,37
Comp. articular	0,43*	0,50*	0,20
Complejo Sicca	0,26	0,15	0,21
Fotosensibilidad	0,29	0,39*	0,06

P<0,05

## Discusión

La técnica de IFI para detectar ANAS es realizada de rutina en pacientes con enfermedades del tejido conectivo especialmente en el LES y Síndrome de Sjögren. Su presencia ayuda a establecer el diagnóstico, pronóstico y en muchas ocasiones, apoya en la toma de decisiones terapéuticas. La utilización de cultivos de células humanas Hep-2 se ha constituido como la alternativa más utilizada para la detección de ANAS a nivel mundial. a pesar de la variabilidad de los sustratos para su obtención, ellas han demostrado una buena sensibilidad y especificidad en pacientes con LES y SS<sup>4,16</sup>. Estas células tumorales se encuentran en proceso de división y contienen abundantes moléculas núcleo-proteicas

que permiten la detección de una amplia gama de autoanticuerpos<sup>2,4</sup>. Por esta técnica se han establecido una serie de patrones “clásicos” de IFI como: moteado, homogéneo, nucleolar, centrómero, periférico, entre otros. Estos patrones pueden estar relacionados con enfermedades específicas del ETCND o pueden sugerir síndromes de sobreposición con entrecruzamiento de marcadores serológicos<sup>17</sup>.

Aunque ha existido la permanente discusión sobre si la ETCND es una entidad independiente, con características clínicas e inmunológicas propias, o si corresponde a un estado temprano de enfermedad que se encuentra en evolución hacia una entidad específica, la revisión de varias publicaciones que incluyen un número importante de pacientes y lar-

gos periodos de seguimiento nos sugiere que: 1) La evolución hacia LES u otra enfermedad es relativamente rara y solo el 10% de los pacientes lo hacen; 2) La mayoría en un término no mayor a tres años, y el 80% lo hace en los 12 primeros meses; 3) La permanencia en el tiempo (más de tres años) de la condición de No Diferenciado, se correlaciona con una baja probabilidad de evolucionar hacia una entidad definida; 4) La presencia del fenómeno de Raynaud, fotosensibilidad y del complejo Sicca ha sido inversamente correlacionada con la evolución hacia LES; 5) Estos pacientes generalmente presentan ANAS positivos y un patrón inmunológico de autoinmunidad relativamente estable en el tiempo<sup>18, 19</sup>. Es por esto que hemos diseñado este estudio utilizando un grupo de pacientes con ETCND para comparar el rendimiento diagnóstico de las técnicas que utilizan como sustrato células Hep-2, Hep-2000® IFI y Colorzyme. Adicionalmente se quiso determinar cuál es la sensibilidad de las células Hep-2000® (IFI y Colorzyme) para identificar la presencia semicuantitativa de anticuerpos contra el sistema SSA/Ro y para ello utilizamos como referencia la prueba por la técnica de ELISA screening (RELISA ENA Single Well Screening Kit, Inmuno concepts, INC), que ha demostrado una muy alta sensibilidad y especificidad para los autoantígenos: SS-A/Ro Sm, RNP, SS-B/La, Scl-70 y Jo-1<sup>20</sup>.

Como ha sido reportado en estudios previos la presencia de ANAS positivos en pacientes con ETCND se encuentra alrededor del 80%<sup>21</sup>, similar a lo encontrado en nuestra población, sin que se pudiera establecer una diferencia importante por las tres técnicas: Hep-2000® 23(88,5%) por IFI y 21 (80,8%) por color, comparadas con 20 (76,9%) por Hep-2 IFI. Tampoco se encontró diferencias significativas entre los patrones, la intensidad de fluorescencia o los títulos de las diluciones por las tres técnicas. Todos los patrones “clásicos” de visualización de los ANAS estuvieron presentes cuando se utilizó la técnica de Hep-2 IFI (excepto el Ro); en la técnica de Hep-2000 IFI no se encontró el patrón homogéneo ni el citoplasmático. En la técnica de color no se observó el patrón nucleolar ni el citoplasmático. En todas las técnicas la forma más frecuente de presentación fue el moteado fino: 50% para color, 34,6% para Hep-2 IFI y 42,93% para Hep 2000® IFI. En ninguno de estos resultados hubo una diferencia

estadísticamente significativa. Es posible para el caso de la técnica Hep-2000® color el patrón nucleolar estuviera enmascarado visualmente por el patrón moteado fino; es por esto que para la interpretación de este tipo de resultados, debe conocerse el compartimiento de la prueba en la población, incluyendo el porcentaje de individuos sanos con resultados positivos<sup>22</sup>.

Cuando se analizó el resultado positivo de las pruebas y su compartimiento en relación con las diluciones, la concentración de mayor rendimiento diagnóstico para las pruebas Hep-2 IFI y Hep-2000® color zyme fue el de 1/320 con 15 (57,7%) y 9 (34,6%) respectivamente. Para la técnica Hep-2000® IFI el mayor porcentaje de positivos se encontró en diluciones 1/80 con un total de siete muestras (26,9%), lo que haría necesario evaluar con precaución resultados “negativos” en dilución de 1/80, título considerado normal por algunos laboratorios. De otra manera, se encontró que en las técnicas Hep-2000® IFI y Hep-2000® Colorzyme, hubo una distribución más uniforme de los resultados positivos hasta diluciones de 1/1280, comparado con la técnica Hep-2, en la que a concentraciones de 1/160, 1/640 no se encontró reactividad. Las técnicas que utilizaron IFI tuvieron una tendencia a concentrar los resultados positivos en el rango de 1/80 a 1/640 a diferencia de Hep-2000® Colorzyme que se concentran más en el rango 1/80 a 1/320, posiblemente relacionado con una menor sensibilidad de la tinción por peroxidasa<sup>23, 24</sup>.

De manera opuesta sobre células Hep-2 por IFI se obtuvo un mayor número de muestras reportadas negativas, que al ser comparadas con los resultados sobre los sustratos Hep-2000®, correspondieron al patrón moteado fino a títulos bajos 1:80. Reportes previos han tratado de explicar este fenómeno en relación con distintos grados de fluorescencia inespecífica causada por anticuerpos heterófilos, autoanticuerpos dirigidos contra constituyentes del citoplasma, que hacen difícil la interpretación clínica de patrones positivos a títulos bajos.

Asimismo, el problema en la detección del autoanticuerpo SSA/Ro al realizar el ensayo de ANAS usando como sustrato células Hep-2 convencionales, ha sido superado gracias a que existen hoy en día diferentes alternativas para la realización de la

prueba. Recientes trabajos han demostrado que las células Hep-2 pueden ser transfectadas con múltiples copias de cDNA que codifican para el antígeno humano Ro/SS-A 60 kDa, y las cuales sobre expresan este antígeno, aumentando la especificidad y sensibilidad para la determinación de anticuerpos anti-Ro/SS-A en los ensayos para ANAS<sup>1, 3, 5</sup>. La línea celular de células Hep-2000® (*Immuno Concepts, Inc*) expresa un 10-15% más antígeno SS-A/Ro cuando se utilizan métodos con tinción fluorescente o con sistema inmunoenzimático considerados como métodos avanzados para la detección de ANAS<sup>7, 25</sup>.

Se comparó adicionalmente la capacidad de detección de autoantígeno SS-A/Ro por las técnicas Hep-2000® IFI y Hep-2000® colorzyme, con los resultados obtenidos por el método específico ELISA (*ELISA ENAS Sera Quest INC*): de las tres muestras positivas por ENAS, 2 fueron identificadas por las células Hep-2000® IFI con sensibilidad del 66% y una por las células Hep-2000® color con una sensibilidad del 33%. Si bien los resultados obtenidos en las células Hep-2000® IFI son similares reportados previamente<sup>4, 6</sup>, estos implican la posibilidad de que algunas muestras positivas no sean detectadas de manera adecuada por este sustrato. La interpretación de los resultados negativos para Ro por las células Hep-2000® Colorzyme, en pacientes con ETCND, según los hallazgos de este estudio requieren de una evaluación posterior en un número mayor de pacientes dado lo pequeña de la muestra, de nuestro estudio.

Una posible explicación para los resultados negativos para Ro por las técnicas Hep-2000® puede estar en relación con la probabilidad (50%) que sueros con anti-SSA/Ro tengan mayor especificidad para otros antígenos, incluyendo el anti-SSB/La, lo que puede resultar en un enmascaramiento de patrones<sup>2, 6</sup>. Desde el punto de vista práctico, la ausencia del patrón específico para Ro sobre las células Hep-2000®, no excluye la presencia de anticuerpos anti-Ro 60kDa o anti Ro 52kDa, como ha sido reportado en estudios previos<sup>4</sup>.

El patrón Ro encontrado en este trabajo fue similar al que ha sido típicamente descrito en las células transfectadas, independiente del método utilizado (IFI - enzimático-Colorzyme). La muestra es identificada como positiva cuando aparece la tinción ca-

racterística sobre el núcleo-plasma y los nucleolos, lo que indica la distribución nuclear del antígeno SSA/Ro<sup>6</sup>. Se observó también la tinción exclusiva del núcleo-plasma sin coloración de los nucleolos, lo que ha sido considerado como representativo de la expresión del antígeno Ro en las células Hep-2000® por algunos autores<sup>2, 26</sup>.

También ha sido reportada la expresión del antígeno Ro en citoplasma. Evidencias bioquímicas soportan la distribución citoplasmática del antígeno al asociarse con el hyRNAs citoplasmático o por la acción de factores mecánicos que favorecen la difusión del antígeno en el citoplasma durante la fijación de la muestra<sup>6, 25</sup>.

Aunque existen escasos reportes que comparan la determinación de ANAS por el sistema Hep-2000® Colorzyme con los métodos de IFI Hep-2000® y Hep-2, estos destacan la ventaja que tiene el método Colorzyme de poder utilizar un microscopio óptico estándar, siendo más accesible para los laboratorios convencionales, sumado a una mayor estabilidad del reactivo de color, que permite un mejor reconocimiento de los patrones y la menor utilización de tinciones inespecíficas, que favorece la definición ANAS a títulos<sup>4, 23, 24</sup>.

En general podemos afirmar que las técnicas que utilizaron células Hep-2000® IFI y Colorzyme lograron la mejor concordancia y buenas correlaciones en los resultados positivos para ANAS, tanto en las diluciones como en los patrones de IFI, mucho mayores a las alcanzadas al compararlas con las células Hep-2. Desde el punto de vista clínico hubo una buena correlación con las células Hep-2000® por los dos métodos, con los hallazgos más relevantes: el fenómeno de Raynaud, el compromiso articular y la fotosensibilidad. Lo anterior ofrece un respaldo clínico a la utilización como medio diagnóstico de las células Hep-2000® en este tipo de pacientes.

## Conclusiones

La utilización de sustratos derivados de cultivos de células humanas Hep-2 sigue siendo una buena alternativa para la determinación ANAS. Las células Hep-2000 transfectadas con Ro de 60 kDa pueden considerarse un sustrato útil y confiable en nuestro medio para su detección, tanto por color como por

IFI. Si bien la posibilidad de identificar el antígeno SSA/Ro en una primera lectura de ANAS por las técnicas de Hep-2000 resulta alentadora, los resultados negativos no excluyen por completo la presencia de anticuerpos anti Ro y en este grupo específico de pacientes con ETCND y podría obligar a su búsqueda por otros métodos. Esta situación debe ser advertida al clínico que interpreta los resultados. Estos resultados preliminares necesitan de comprobación en un grupo más grande de pacientes con enfermedades específicas del tejido conectivo, que permitan validar los resultados y establecer el verdadero significado en nuestro medio.

## Referencias

- Bossuyt X, Frans J, Hendrickx A, Godefridis G, Westhovens R, Marien G. Detection of anti-SSA antibodies by indirect immunofluorescence. *Clin Chem* 2004; 50(12): 2361-2369.
- Pollock W, Toh BH. Routine immunofluorescence detection of Ro/SS-A autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SS-A. *J Clin Pathol* 1999; 52(9): 684-687.
- Bossuyt X, Meurs L, Mewis A, Marien G, Blanckaert N. Screening for autoantibodies to SS-A/RO by indirect immunofluorescence using HEp-2000 cells. *Ann Clin Biochem* 2000; 37 (Pt 2): 216-219.
- Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clin Chem* 2002; 48(12): 2171-2176.
- Peene I, Meheus L, Veys EM, De Keyser F. Detection and identification of antinuclear antibodies (ANA) in a large and consecutive cohort of serum samples referred for ANA testing. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(12): 1131-1136.
- Fritzler MJ, Miller BJ. Detection of autoantibodies to SS-A/Ro by indirect immunofluorescence using a transfected and overexpressed human 60 kD Ro autoantigen in HEp-2 cells. *J Clin Lab Anal* 1995; 9(3): 218-224.
- Keech CL, Howarth S, Coates T, Rischmueller M, McCluskey J, Gordon TP. Rapid and sensitive detection of anti-Ro (SS-A) antibodies by indirect immunofluorescence of 60kDa Ro HEp-2 transfectants. *Pathology* 1996; 28(1): 54-57.
- Alarcón SG. Síndromes indiferenciados y de sobreposición del tejido conectivo. *Rev Mex Reumat* 2002; 17: 199-105.
- Alarcon GS, Willkens RF, Ward JR, et al. Early undifferentiated connective tissue disease. IV. Musculoskeletal manifestations in a large cohort of patients with undifferentiated connective tissue diseases compared with cohorts of patients with well-established connective tissue diseases: followup analyses in patients with unexplained polyarthritis and patients with rheumatoid arthritis at baseline. *Arthritis Rheum* 1996; 39(3): 403-414.
- Tan EM. The 1982 Revised Criteria for the Classification of Eritematosus Sistemic Lupus Arthritis Rheum 1982; 25(11): 1271-1277.
- Alfonse T. Masi. Preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). *Arthritis Rheum* 1980; 23(5): 581-590.
- Frank C. Arnett. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1980; 23 (3): 341-345.
- Claudio Vitali. Preliminary criteria for the classification of Sjögren's syndrome. Results of a prospective concerted action supported by the European community. *Arthritis Rheum* 1980; 23 (3): 341-345.
- Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, et al. Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9): 1601-1611.
- Kidd K, Cusi K, Mueller R, Goodner M, Boyes B, Hoy E. Detection and identification of significant ANAs in previously determined ANA negative samples. *Clin Lab* 2005; 51(9-10): 517-521.
- Homburguer H. Cascade Testing for Autoantibodies in Connective Tissue Diseases. *Mayo Clin Proc* 1995; 70(2): 183-184.
- Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, et al. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2003; 349(16): 1526-1533.
- Bulpitt KJ, Clements PJ, Lachenbruch PA, et al. Early Undifferentiated Connective Tissue Disease: III. Outcome and Prognostic Indicators in Early Scleroderma (Systemic Sclerosis). *Ann Intern Med* 1993; 118 (8): 602-609.
- Carwile Leroy, Undifferentiated connective tissue syndromes. *Arthritis Rheum* 1980; 23(3): 341-343.
- Meheus L, Wiik A, Charles PJ, Tzioufas AG, Meyer O, Steiner G, Gianola D, Bombardieri S, Union A, De Keyser S, Veys E, De Keyser F. Multicenter validation of recombinant, natural and synthetic antigens used in a single multiparameter assay for the detection of specific antinuclear autoantibodies in connective tissue disorders. *Clin Exp Rheumatol* 1999; 17(2): 205-214.
- Mosca MT, A. Neri, R. Vincivelli, W. Bombandierie, S. Undifferentiated connective tissue diseases: the clinical and serological profiles of 91 patients followed for at list one year *Lupus* 1998; 7: 95-100.
- Fritzler MJ, Hanson C, Miller J, Eystathioy T. Specificity of autoantibodies to SS-A/Ro on a transfected and overexpressed human 60 kDa Ro autoantigen substrate. *J Clin Lab Anal* 2002; 16(2): 103-108.
- Fritzler MJ, Wall W, Gohill J, Kinsella TD, Humbel RL. The detection of autoantibodies on HEp-2 cells using an indirect immunoperoxidase kit (Colorzyme). *Diagn Immunol* 1986; 4(4): 217-221.
- Zabek J. Assessment methods of autoantibodies in autoimmune diseases. *Przegl Epidemiol* 2002; 56 Suppl 4: 59-66.
- Keech CL, McCluskey J, Gordon TP. Transfection and overexpression of the human 60-kDa Ro/SS-A autoantigen in HEp-2 cells. In: *Clin Immunol Immunopathol*; 1994: 146-151.
- Peene I, Van Ael W, Vandenbossche M, Vervaeke T, Veys E, De Keyser F. Sensitivity of the HEp-2000 substrate for the detection of anti-SSA/Ro60 antibodies. *Clin Rheumatol* 2000; 19(4): 291-295.