

DOCUMENTOS TÉCNICOS PARA EL LABORATORIO CLÍNICO

RECOMENDACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

JULIO, 2016

AUTORES

BQ. Hugo Moscoso E.

Jefe Subdepartamento Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Carolina Valenzuela B.

Jefe Sección Inmunología.
Subdepartamento de Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES INTERNOS

TM. Ana María Castillo M.

Profesional Sección Inmunología.
Subdepartamento de Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Leopoldo Galdames V.

Profesional Sección Inmunología.
Subdepartamento de Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

BQ. Ingrid Mansilla C.

Profesional Sección Inmunología.
Subdepartamento de Enfermedades No Transmisibles.
Departamento Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

Dra. Verónica Ramírez M.

Jefe Subdepartamento Coordinación Externa.
Departamento Biomédico Nacional y de Referencia.
Instituto de Salud Pública de Chile.

REVISORES EXTERNOS

Dra. Patricia Abumohor G.

Miembro Sociedad Chilena de Reumatología.

TM. Marcela Crespo O.

Miembro Sociedad Chilena de Química Clínica.

QF. Andoni Etcheverry L.

Miembro Comité PEEC.

TM. Rebeca Montalva D.

Miembro Comité PEEC.

TM. Marcelo Ramírez S.

Miembro Comité PEEC.

Dra. Angélica Rivera M.

Miembro Sociedad Médica de Laboratorio Clínico.

RECOMENDACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

RESUMEN

El siguiente documento establece recomendaciones para la ejecución de las metodologías mayormente usadas por los laboratorios clínicos en Chile, inmunofluorescencia indirecta (IFI) y enzaimunoenálisis (ELISA) para la determinación de diversos autoanticuerpos utilizados como marcadores serológicos en diferentes enfermedades autoinmunes. La IFI que inició la pesquisa de autoanticuerpos en los años 70, se complementa en la actualidad con nuevos inmunoensayos disponibles.

ALCANCE

Estas recomendaciones aplican a las determinaciones de autoanticuerpos por inmunofluorescencia indirecta y por enzaimunoenálisis realizado en los laboratorios clínicos.

INTRODUCCIÓN

La detección de autoanticuerpos dirigidos contra distintas estructuras propias del organismo, en algunos casos ubicadas en todas las células y en otros casos en tejidos específicos, constituye un conjunto de marcadores inmunológicos característicos de una variedad de enfermedades autoinmunes. Principalmente ayudan al diagnóstico, y en algunos casos al pronóstico y/o seguimiento de patologías como las enfermedades del tejido conectivo (ejemplos: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide), enfermedades gastrointestinales autoinmunes (ejemplos: enfermedad celíaca, anemia perniciosa), enfermedades inflamatorias de pequeños vasos

sanguíneos o vasculitis (ejemplos: granulomatosis con poliangeítis- antes denominada granulomatosis de Wegener, síndrome de Churg-Strauss o angeítis granulomatosa alérgica) o las que afectan a un órgano como las enfermedades autoinmunes del hígado (ejemplos: cirrosis biliar primaria, hepatitis autoinmune), enfermedades autoinmunes de la tiroides (ejemplos: tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves), entre muchas otras.

Desde los años 70, la inmunofluorescencia indirecta ha permitido detectar autoanticuerpos con las ventajas de su simple ejecución y la adecuada sensibilidad y especificidad diagnóstica que en general otorga para la detección de estos marcadores. Sin embargo, el consumo de tiempo en la lectura al microscopio y la competencia del laboratorista en esta acción determina, en gran medida, la validez de los resultados. Hoy los laboratorios tienen la opción de equipos automatizados para realizar esta metodología.

En el transcurso del tiempo la tecnología ha permitido disponer de otros inmunoensayos, entre ellos ELISA, que tienen la ventaja de pesquisar el componente antigénico específico que detecta el respectivo autoanticuerpo, ya sea de forma colectiva (screening) e individual (único ó perfil) por corrida; además la metodología es de simple ejecución y su detección permite la obtención de un resultado que no es dependiente del operador.

A pesar de las ventajas que ofrecen los diversos inmunoensayos frente a IFI para diferentes autoanticuerpos, es importante indicar que en algunos casos se han complementado y en otros aún no han logrado reemplazarla.

Estas recomendaciones se originan del trabajo realizado en siete Talleres de Autoinmunidad (17 y

18 de octubre de 1996, 5 de diciembre 1997, 3 de noviembre de 2000, 6 de diciembre 2004, 2-3 de septiembre 2010; 29-30 de noviembre 2012, 7 de julio 2014) con la participación de los profesionales de laboratorios de la Red de Inmunología del país, orientados a la armonización de las metodologías para la determinación de autoanticuerpos.

TERMINOLOGIA

- AAN:** Anticuerpos anti-nucleares
- ANCA:** Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos
- CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute
- dsDNA:** ADN de doble hebra (del inglés double strand DNA)
- ELISA:** Enzaimunanoálisis; del inglés enzyme linked immunosorbent assay
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína; del inglés fluorescein isothiocyanate
- F/P:** Relación fluorocromo/proteína
- IFI:** Inmunofluorescencia indirecta
- LED:** Diodo emisor de luz; del inglés light-emitting diode
- LKM:** Antígeno microsomal del hígado y riñón; del inglés liver, kidney microsomal antigen.
- MBG:** Membrana basal del glomérulo
- MPO:** Mieloperoxidasa
- PR-3:** Proteinasa 3
- VAA:** Vasculitis asociada a ANCA

DESARROLLO

REQUISITOS TÉCNICOS (basados en elementos de calidad analítica y metrológica)

El laboratorio debe verificar en caso de usar kit comercial, ó validar en caso de usar metodología implementada en el laboratorio con el fin de asegurar el uso previsto de su aplicación.

1. Autoanticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (IFI)

1.1. En el procedimiento general para la determinación de autoanticuerpos por inmunofluorescencia indirecta (autoanticuerpos AAN, anti-dsDNA, anti-mitocondrial, anti-músculo liso, anti-células parietales gástricas, anti-LKM1, anti-tiroglobulina, anti-microsomal, anti-endomiso, anti-membrana basal del glomérulo y ANCA) considerar los siguientes aspectos:

- En la utilización de reactivos comerciales, se deben seguir las instrucciones de uso indicados por el fabricante (inserto técnico en español).
- De acuerdo al autoanticuerpo a determinar se debe seleccionar el sustrato, considerando tejido o célula, agentes fijadores y grado de sensibilidad y especificidad diagnóstica.
- El conjugado que se debe utilizar es anti-IgG humana-FITC, de preferencia con relación F/P 2 a 3 para los autoanticuerpos, a excepción de anti-endomiso (punto 1.5) y ANCA (punto 1.6). Si el conjugado no es de kit, se debe usar en la dilución de trabajo determinada por el laboratorio por el método "tablero de ajedrez".
- La determinación de autoanticuerpos por IFI debe incluir control positivo con trazabilidad demostrada para los autoanticuerpos que disponen de material de referencia primario y control negativo de suero humano. Incluir ambos controles por cada placa. Si es equipo automatizado, incluirlos en cada corrida por número de lote de placa.
- En caso de no cumplir el control de calidad, se invalida la placa ó corrida. Se debe revisar el procedimiento realizado, la vigencia de cada componente del ensayo, las diluciones aplicadas, los tiempos de incubación, el estado de los controles aplicados y por último la condición del microscopio y/ó equipo automatizado.
- La lectura de autoanticuerpos debe realizarse en un microscopio de epifluorescencia con lámpara de mercurio de 100 watts o con iluminación LED.

- g) Si el microscopio posee lámpara de mercurio, mantener registro de horas de uso de ésta. Para lámpara de mercurio ó iluminación LED se recomienda utilizar un portaobjeto para control de intensidad de fluorescencia de origen comercial.
- h) Como medio de contraste se recomienda utilizar Azul de Evans.
- i) El líquido de montaje puede ser tampón fosfato salino-glicerol o Tris-glicerol. Se recomienda el uso de Tris-glicerol porque otorga mayor estabilidad al fluorocromo.
- j) Mantener registros actualizados de los reactivos utilizados (Nº de lote, fecha de expiración y fabricante).
- k) Mantener registro de cada determinación con sus resultados y la identificación del profesional responsable de la emisión.
- l) El uso de equipo automatizado para IFI debe seguir las indicaciones del fabricante.
- m) Ante cambio de metodología IFI desde manual a automatizada, se debe realizar verificación del método y un estudio de comparación de ambas metodologías. Se sugiere aplicar el documento CLSI EP12-A2 "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition"
- n) Ante cambio de microscopio con iluminación de lámpara de mercurio a LED, se debe validar en las mismas condiciones de aumento (40x), apertura numérica (0,65), filtro secundario v/s intensidad de fluorescencia.
- e) La incubación de los sustratos con los sueros se debe realizar en cámara húmeda y a temperatura ambiente (20° a 26°C).
- f) Escurrir los sueros y controles de las láminas evitando que se mezclen entre sí.
- g) La incubación con el conjugado debe ser realizada en oscuridad.
- h) Para los lavados manuales post incubación con suero y conjugado, deben efectuarse 2 lavados de 10 minutos cada vez en tampón fosfato salino 0,01M; pH 7,2 a temperatura ambiente (20° a 26°C) en agitación constante.
- i) El conjugado se debe utilizar en la dilución indicada por el fabricante o la establecida por el laboratorio. En los conjugados diluidos se debe evitar cambios frecuentes en su temperatura de almacenamiento a uso, es decir, de 2 a 8 °C a temperatura ambiente. Debería ser alicuotado y almacenado a la temperatura indicada en oscuridad hasta su uso.
- j) Las muestras positivas se deben titular a punto final en diluciones múltiplo de 2 hasta un título final 1/1280.
- k) Para denominación de patrones AAN se recomienda adoptar la nomenclatura basada en el segundo consenso brasileño, "II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in HEp-2 cells" a lo menos en los patrones de reporte obligatorio. Ver figura 1.
- l) En el informe se debe indicar resultado AAN, título y patrón; resultado citoplasma, título y patrón. Además debe indicar metodología y el sustrato.

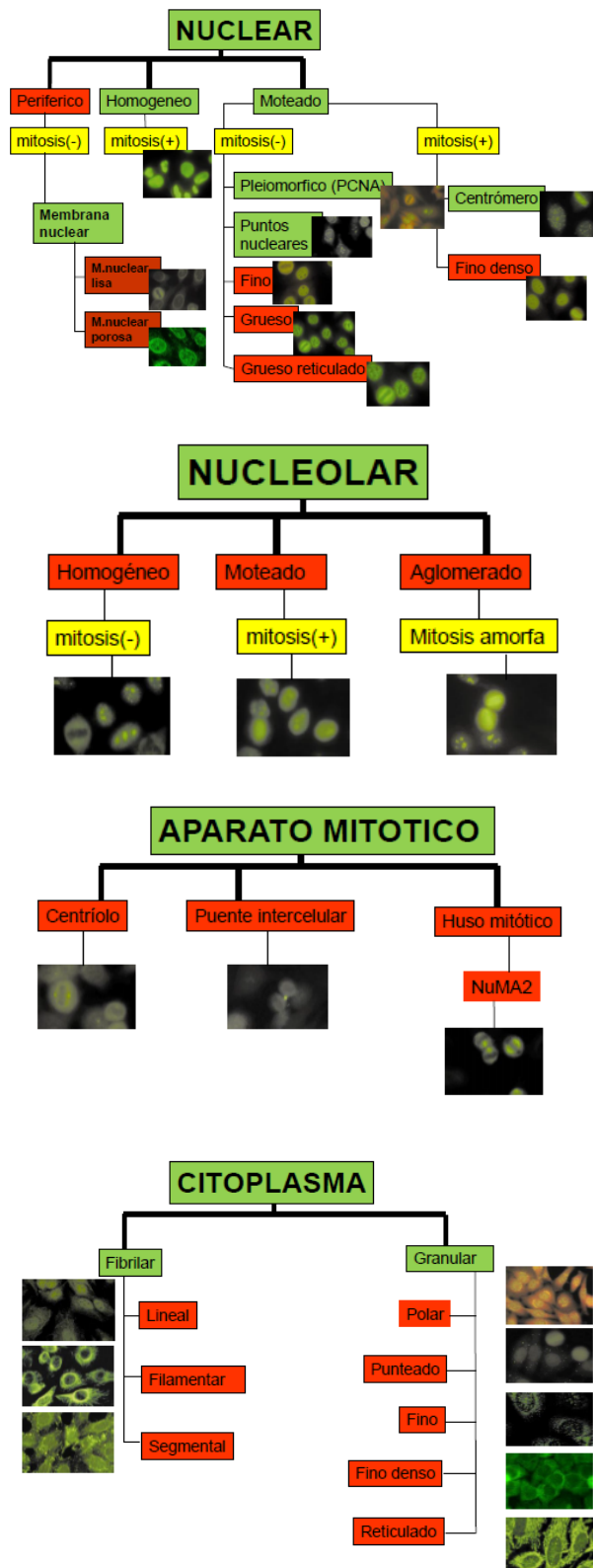
1.2. En el procedimiento de la determinación de AAN por IFI considerar:

- a) La inmunofluorescencia indirecta es el método de referencia para la determinación de AAN.
- b) Se recomienda incluir en el procedimiento, además de sueros control, un suero positivo crítico o de punto final.
- c) Para screening en células HEp-2 se recomiendan las diluciones 1/40 y 1/160.
- d) El tiempo de exposición de las láminas (sustratos) al medio ambiente luego de retirarlo de su envoltura debe ser el indicado por el fabricante.
- m) Cuando el laboratorio disponga de material de referencia terciario o controles expresados en UI/mL, el resultado debería expresarse en esta unidad, además del título correspondiente.

Figura 1:

Algoritmo para clasificación de patrones AAN

(basado en II Consenso Brasileño; Rev. Bras. Reumatol; 2003, Vol 3, N°3, p 129-140)



de reporte obligatorio



de reporte opcional



guía para interpretación

1.3. En la determinación de anticuerpos anti-DNA por inmunofluorescencia indirecta considerar:

- a) Para screening en *Crithidia luciliae* se recomiendan las diluciones 1/5 y 1/10.

1.4. En la determinación de anticuerpos anti-músculo liso, anti-mitocondrial, anti-células parietales gástricas, anti-LKM1, anti-tiroglobulina y anti-microsomal por IFI considerar:

- a) Para screening se recomiendan las diluciones 1/20 y 1/100.
- b) La titulación a punto final es optativa a cada laboratorio.

1.5. En la determinación de anticuerpos anti-endomiso por inmunofluorescencia indirecta considerar:

- a) Para screening se recomiendan las diluciones 1/5 y 1/10.
- b) Si no se utilizan reactivos comerciales, usar conjugado anti-IgA humana-FITC en la dilución de trabajo determinada por el laboratorio.
- c) La titulación a punto final es optativa a cada laboratorio.

1.6. En la determinación de ANCA por inmunofluorescencia indirecta considerar:

- a) Se recomienda dilución de screening 1/20 usando sustrato fijado en etanol; se sugiere dilución 1/100 con el fin de detectar fenómenos de prozona.
- b) Se debe incluir controles positivos para pANCA, cANCA y un control negativo. Para cada lote de placas se recomienda incluir suero control para ANCA atípico.
- c) Si no se usan reactivos comerciales, el conjugado debe ser anti-IgG humana F(ab')₂-FITC utilizado en la dilución de trabajo determinada por el laboratorio.
- d) En sustrato fijado con etanol, si el patrón es cANCA, se recomienda complementar con ELISA cuantitativo para PR-3.

- e) En sustrato fijado con etanol, si el patrón es pANCA, debería confirmarse con sustrato fijado con formalina; se recomienda complementar con ELISA cuantitativo para MPO.
- f) Al obtener fluorescencia nuclear en sustrato fijado con formalina, descartar AAN+ antes de informar ANCA atípico.
- g) Usar denominación ANCA atípico por el valor diagnóstico que tendría en otras enfermedades no VAA.
- h) La lectura por IFI debería ser realizada a lo menos por dos operadores diferentes y competentes.
- i) En el informe indicar el resultado ANCA, dilución de screening y patrón. Además, indicar metodología, nombre del sustrato y tipo de fijación (etanol y/o formalina).

2. Autoanticuerpos por enzaimunoenálisis (ELISA):

- a) En el caso de las determinaciones de AAN y dsDNA positivas por ELISA, se sugiere confirmar por IFI.
- b) De acuerdo al autoanticuerpo a determinar, se debe seleccionar el kit a usar en conocimiento de la composición antigénica, origen (humano o animal, nativo, sintético ó recombinante), sistema de purificación (químico, columnas cromatográficas o inmunoadsorción), tipo de unión del antígeno a la placa, sensibilidad y especificidad.
- c) En la utilización de reactivos comerciales se deben seguir las instrucciones de uso indicados por el fabricante (inserto técnico en español).
- d) La exposición de los pocillos al medio ambiente debe seguir las indicaciones del fabricante.
- e) Verificar la trazabilidad de los calibradores o controles cuando corresponda según la disponibilidad de material de referencia primario.
- f) Se debe verificar la conformidad del control de calidad interno indicado por el fabricante. Llevar registros; se recomienda llevar en gráficas de Levey y Jennings. En caso de no conformidad del control interno se debe revisar la lon-

gitud de onda usada para la lectura, revisar los tiempos de incubación, revisar la estabilidad del conjugado de acuerdo a las absorbancias en los ensayos anteriores y revisar el estado del cromógeno en uso.

- g) Realizar las lecturas de absorbancia en un lector de placas debidamente calibrado en la escala de longitud de onda y absorbancia UV-VIS. Disponer de un programa de mantenciones preventivas al día y sus respectivos registros.
- h) El laboratorio debería verificar el valor de corte positivo propuesto por el fabricante.
- i) Se recomienda que el informe incluya, en caso que corresponda, la composición antigénica y origen de los antígenos. Además se recomienda que incluya el resultado expresado en las unidades indicadas en el inserto, el método, el intervalo y/o valor de referencia señalado por el fabricante o el utilizado por el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

A los profesionales de la Red de Laboratorios de Inmunología expositores y asistentes, que han participado de los siete talleres de autoinmunidad, por su colaboración en las presentaciones realizadas y en las observaciones compartidas en éstos, realizados bajo la coordinación del Laboratorio Nacional y de Referencia de Inmunología del Instituto de Salud Pública. Una mención especial para QF. Darwins Castillo A. quien inició y estimuló el trabajo sistemático de talleres y documentos técnicos de consenso en el área de autoinmunidad a nivel nacional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Kern, P, Kron, M and Hiesche, K. Measurement of Antinuclear Antibodies: Assesment of Different Test Systems. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 2000; 72-78.
- 2.- Kumar, Y, Bhatia, A and Walker Minz, R. Antinuclear Antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: a journey revisited. *Diagnostic Pathology*. 2009; 4:1-10.

- 3.- Cabiedes, J and Nuñez-Alvarez, C. Anticuerpos antinucleares. *Reumatol. Clin*. 2010; 224-230.
- 4.- Bogdanos, D, Invernizzi, P, Mackay, I and Vergani, D. Autoimmune liver serology: Current diagnostic and clinical challenges. *World J. Gastroenterol*. 2008; 14(21):3374-3387.
- 5.- Hill, I.D. What are the Sensitivity and Specificity of serologic test for celiac disease? *Gastroenterology*.2005; 128 (4): s25-s32.
- 6.- Galofré JC. y Davies TF. Utilidad clínica de los anticuerpos antitiroideos. *Rev. Med. Univ. Navarra*. 2008; 52(2): 3-8.
- 7.- Savige J, Dimech W, Fritzler M, Goeken J, Hagen E.C, Jannette JC, Mc Evory R, Pussey C, Pollock W, Trevisin M, Wiik A, and Wong R. for International Group for Consensus Statement on Testing and Reporting on Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies (ANCA). Addendum to the International Consensus Statement on Testing and Reporting of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies. *Am. J. Clin. Pathol*. 2003; 120: 312-318.
- 8.- Carballo G, Ingénito F, Ginaca A, Carvajal P, Costa M. y Balbaryski J. Primer Consenso Argentino para Estandarización de la determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta HEp-2. *Acta Bioquím. Clin. Latinoam*. 2012; 46(1): 3-13.
- 9.- Dellavance Alessandra, Gabriel Júnior Alexandre, Cintra Alice F. U, Ximenes Antônio Carlos, Nuccitelli Barbara, Tabilerti Ben Hur, Moreira Caio, von Mühlen Carlos Alberto, Bichara Carlos David, dos Santos Cláudio Henrique Radmos, Yano Cristiane Martinez, Mangueira Cristovão Luis Pitangueira, Carvalho Darlene Gonçalves, Bonfá Eloísa Silva Dutra de O, Doi Elvira M, Guimarães Fabiana Nunes de Carvalho, e Araújo Flávia Ikeda, Mundim Hugo Mendonça, Rego Jozelia, Vieira Lisiane Ericonio dos Anjos, Poli Luciana, Andrade Luís Eduardo Coelho, Callado Maria Roseli, Mesquita Mauro Meira, Sugiyama Mitiko; Shessarenko Natascha, da Silva Nilzio Antônio, Carballo Orlando Gabriel, Leser Paulo Guilherme, Francescantonio, Paulo Luiz Carvalho, Jarach Renata, Xavier

Ricardo Machado, Levy Roger Abramino, Neves Suzane P. F, Cruvinel Wilson de Melo, dos Santos Wilton Silva. II Brazilian Consensus on Antinuclear Antibodies in Hep-2 Cells. Rev. Bras. Reumatol; 2003; 3(3): 129-140.

- 10.- CLSI Document EP12-A2 "User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline—Second Edition".