

Análisis comparativo de tres métodos de ELISA frente a Inmunodot para la determinación de antígenos extraíbles del núcleo (ENAs)

Natividad López Riquelme¹, M^a Dolores Dosda González¹, Francisco Antonio Ramírez Garrido¹,
Obdulia Noguera Moya², Antonia Espasa Sempere³, Daniel Cañas Bello²

¹Laboratorio Análisis Clínicos del Hospital General Universitario de Elche, ²Hospital Vega Baja de Orihuela,
³Hospital General Universitario de Alicante

COMPARATIVE ANALYSIS OF THREE ELISA METHODS VERSUS SIMPLE DOT-BLOT METHOD FOR THE DETERMINATION OF EXTRACTABLE NUCLEAR ANTIGENS (ENA)

Recibido: 6 Abril 2009

Aceptado: 6 Mayo 2009

RESUMEN

La detección y la especificidad de los autoanticuerpos contra antígenos extraíbles del núcleo (ENA) tienen un importante papel en la ayuda al diagnóstico de ciertas enfermedades autoinmunes. Existen diversos métodos para detectar estos autoanticuerpos entre los que se encuentran el enzimoanálisis (ELISA) y el "Inmunodot" como los más utilizados.

En este estudio evaluamos cuatro métodos para la detección de ENAs, comparando un ensayo Inmunodot frente a tres ensayos ELISA. Se analizaron muestras de 26 pacientes en las que fueron determinados los autoanticuerpos antinucleares (ANAs) por Inmunofluorescencia (IFI) y los anticuerpos frente a ENAs (Ro, La, Sm-RNP, Sm, Scl-70 y Jo-1) por Inmunodot y por los tres ensayos de ELISA. Se obtuvo que en un 27% de los casos todas las técnicas eran coincidentes en el resultado y se correlacionaron con los síntomas clínicos del paciente. La concordancia entre las técnicas de ELISA evaluadas fue de un 88% para ELISA 1 vs 2, 73% para ELISA 1 vs 3 y 73% para ELISA 2 vs 3, y la de los métodos de ELISA frente al método de Inmunodot fueron de un 38%, 42% y 27% (vs ELISA 1, 2 y 3 respectivamente).

Las técnicas de ELISA tienen un porcentaje de concordancia entre sí más alto que con Inmunodot, y además se correlacionan mejor con los síntomas clínicos y el patrón ANA del paciente. Los resultados muestran que la presencia de autoanticuerpos ENA no siempre tiene relación con la presentación clínica del paciente, por ello el laboratorio y el clínico deben ser conscientes de la sensibilidad y la especificidad de cada método empleado en el laboratorio clínico.

PALABRAS CLAVE: Antígenos extraíbles del núcleo/ Autoanticuerpos/ Enzimoanálisis/ Inmunodot.

ABSTRACT

The detection and the specificity of the autoantibodies to extractable nuclear antigens (ENAs) play a critical role in the development of the diagnosis of certain autoimmune diseases. There are several methods to detect these autoantibodies, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) or the simple dot-blot are the most frequently used.

Here, we evaluate four methods to detect ENAs, namely an Immunodot test along with three different ELISA tests. Twenty six samples of patients were analysed. Antibodies to nuclear antigens (ANAs) were determined by indirect immunofluorescence (IFI), whereas antibodies to different ENAs (Ro, La, Sm-RNP, Sm, Scl-70 and Jo-1) were determined by simple dot-blot and by the three ELISA tests. In 27% of the cases all the techniques yielded similar results, and were related to the clinical symptoms of the patient. The concordance among the different ELISA techniques tested was 88% for ELISA 1 vs 2, 73% for ELISA 2 vs 3, and 73% for ELISA 1 vs 3. The concordance of the ELISA methods with the Immunodot was 38%, 42% and 27% for ELISA 1, 2, and 3, respectively.

The ELISA techniques obtained a higher percentage of concordance among them than with Immunodot and, moreover, they related better to the clinical symptoms and ANA pattern of the patients. The results also show that the presence or the specific type of ENA autoantibody does not always have a relation to the clinical status of the patient, so that the laboratory and the clinic must be conscious of the sensitivity and specificity limits of each method used in the clinical laboratory.

KEY WORDS: Autoantibody/ Enzyme-linked immunosorbent assay/ Extractable Nuclear Antigens/ Simple dot-blot.

TABLA I. Perfil de anticuerpos antinucleares en enfermedades autoinmunes sistémicas

Anticuerpos frente a	LES*	EMTC*	Enfermedad (% Positivos)		
			Síndrome de Sjögren	Esclerodermia	DM/PM*
SSA/Ro	30-40	<5	60-70	<5	<5
SSB/La	15	<5	45-60	<5	<5
Sm	30-40	<5	<5	<5	<5
Scl-70	<5	<5	<5	20-30	<5
U1-RNP	35-45	95-100	<5	20	<5
Jo-1	<5	<5	<5	<5	30

*LES: *Lupus eritematoso sistémico*; EMTC: *Enfermedad mixta del tejido conectivo*; DM/PM: *Dermatomiositis-Polimiositis*.

INTRODUCCIÓN

La activación de la respuesta inmune es un rasgo principal de muchas enfermedades. La respuesta inmune puede ser protectora y beneficiosa, como en enfermedades infecciosas, o destructiva y perjudicial, como en enfermedades autoinmunes inflamatorias, o poseer ambas cualidades. La respuesta inmune por lo general implica la activación tanto de linfocitos T como B, siendo estos últimos los que producen los anticuerpos que pueden ser detectados en el suero humano y pueden usarse como marcadores predictivos de ciertas enfermedades. Dependiendo de la enfermedad autoinmune de la que se trate, nos encontraremos con distintos autoanticuerpos. El papel del laboratorio en la clasificación, apoyo diagnóstico y pronóstico de algunas enfermedades autoinmunes es indispensable. La utilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio va a depender de muchos factores, como la sensibilidad y especificidad de los métodos utilizados, y estos resultados deben ser siempre analizados en el contexto clínico del paciente, ya que éstos constituyen un apoyo y no aseguran un diagnóstico⁽¹⁾.

Los procedimientos técnicos para detectar los anticuerpos están condicionados por la forma disponible del Ag (purificado o no) y/o la especificidad y sensibilidad de los métodos de detección.

Los autoanticuerpos antinucleares (ANA) van dirigidos contra una gran variedad de estructuras intranucleares (DNA, RNA, etc.). La investigación de los ANA es un prueba de cribado esencial para el diagnóstico de Lupus Eritematoso sistémico (LES) y de otras conectivopatías. Dentro de este grupo de autoanticuerpos encontramos los que reconocen "antígenos nucleares extraíbles" o ENAs, que van dirigidos contra proteínas nucleares no histonas que pueden extraerse del núcleo con soluciones salinas de baja fuerza iónica. Entre éstos sería deseable limitar el estudio a aquellos autoanticuerpos que han demostrado su utilidad en el diagnóstico clínico o como criterio de clasificación. Estos son Ro (SS-A), La (SS-B), Sm, RNP, Scl-70 y Jo-1^(2,3).

La búsqueda de autoanticuerpos específicos contra estos ENAs tiene utilidad en la práctica clínica dadas sus asociaciones con determinadas manifestaciones clínicas y enfermedades (Tabla I).

La interpretación del significado clínico y el papel de estos autoanticuerpos en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes sistémicas se basan en la información ganada a partir de las técnicas usadas para su detección⁽⁴⁾. Algunas de estas están basadas en la inmunoprecipitación en gel, en la inmunodifusión doble y en la cotraimmunolectroforesis⁽⁵⁾. En la actualidad se utilizan habitualmente técnicas como los enzimoanálisis (ELISA) y los Inmunodot, cuyas sensibilidades y especificidad dependen del tipo de antígeno que utilicen para detectar los distintos autoanticuerpos.

Se han evaluado, en diversos estudios, las técnicas anteriores para la determinación de los ENAs y se ha visto que ninguna es lo suficientemente sensible y específica para la detección de estos autoanticuerpos⁽¹⁾. Por ello, cada laboratorio debe evaluar el uso de dos técnicas complementarias para la detección de los ENAs.

El objetivo de este estudio es evaluar la relación entre el resultado obtenido por IFI, para la detección de ANA, con los obtenidos por Inmunodot y 3 técnicas de ELISA para la detección y la identificación de anticuerpos anti-ENA. Se comparan a su vez estos resultados con la clínica y el diagnóstico del paciente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras

Durante un período de 6 meses se recogieron muestras de suero pertenecientes a pacientes en estudio por sospecha o diagnóstico de enfermedad autoinmune procedentes del Servicio de Reumatología. Se estudiaron un total de 59 muestras, en las que se solicitaba la determinación de ENAs. En todas

ellas se determinaron los ANA por inmunofluorescencia (IFI) y el "screening" de ENAs por el método de Inmunodot. Las muestras que fueron negativas para los ENAs por Inmunodot se confirmaron por la técnica de ELISA (6, Orgentech-Labotech). Todas las muestras positivas para alguno de los ENAs por Inmunodot -un total de 26 muestras- se guardaron congeladas a -80°C para analizarlas posteriormente por el resto de técnicas. Se utilizaron 3 técnicas de ELISA de distintas casas comerciales. Para conocer el diagnóstico de estos pacientes, se realizó una revisión retrospectiva de sus historias clínicas.

Inmunofluorescencia indirecta

La presencia de ANAs fue determinada mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) en células Hep-2. Diluciones sucesivas de los sueros a estudiar se incubaron durante media hora a temperatura ambiente en portas de células Hep-2 (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG). Después de lavar se volvió a incubar durante media hora con conjugado antigammaglobulina tipo IgG-fluoresceína. Tras lavar el exceso de conjugado, observamos la emisión de fluorescencia de las preparaciones al microscopio (400x). Fueron considerados ANA positivos aquellos que presentaron títulos $\geq 1:80$. Los patrones de tinción que observamos fueron:

- Homogéneo: Fluorescencia difusa cubriendo los núcleos.
- Periférico: Anillo de fluorescencia delimitando la cara interna de la membrana nuclear.
- Moteado: Los núcleos aparecen con un punteado, más o menos grueso, de fluorescencia.
- Nucleolar: La fluorescencia aparece concentrada en 1-5 puntos gruesos por célula.

Inmunodot

Se determinaron los anticuerpos frente a ENAs en sueros de pacientes que manifestaban una enfermedad autoinmune sistémica o presentaban indicios de padecerla. Se empleó el ensayo de Inmunodot ANA Dot (ANA Dot, Generic Assays, Kahlewitz, Alemania). Este Inmunodot determina la presencia de los ENAs en una tira de soporte de plástico que contiene los siguientes antígenos específicos: La (50 kDa, de origen bovino), Sm (proteína D, 16kDa de origen bovino), Sm-RNP (68 kDa, A, C, BB', D, de origen bovino), Jo-1 y Scl-70 (de origen bovino) y antígenos humanos recombinantes Ro (60 kDa).

ELISA

Los kit de ELISA que se usaron fueron los siguientes:

- ELISA-1 de Orgentech-Labotech (distribuido por Palex) para la cuantificación de autoanticuerpos de tipo IgG, que utiliza antígenos nativos altamente purificados de Sm-RNP, Scl-70, Jo-1, Ro (52 y 60 kDa) y Sm, y antígenos recombinantes humanos para La.

- ELISA-2 de Orgentech-Alegria (distribuido por Palex), que utiliza antígenos nativos altamente purificados de Sm-RNP, Scl-70, Jo-1, La, Ro (52 y 60 kDa) y Sm.
- ELISA-3 de Phadia-INMUNOCAP250, que utiliza antígenos humanos recombinantes para la determinación de La, Ro (52 y 60kDa), Scl-70 (topoisomerasa I), Jo-1 y Sm-RNP (U1), y antígenos nativos de origen bovino para la determinación de Sm.

Las concentraciones de los autoanticuerpos fueron calculadas para cada uno de ellos e interpretadas de acuerdo con las recomendaciones de cada fabricante.

RESULTADOS

De las 59 muestras seleccionadas, 33 dieron resultado negativo en la determinación de ANA por IFI y de anticuerpos frente a ENAs por Inmunodot, confirmando el resultado por la técnica de ELISA-1. Las 26 muestras restantes fueron positivas por Inmunodot para alguno de los ENAs y se procedió a su análisis por los tres métodos de ELISA empleados. Los resultados obtenidos de estas 26 muestras se muestran en la Tabla II junto con la sospecha clínica o el diagnóstico definitivo del paciente.

De las 26 muestras estudiadas, en un 27% coincidieron los resultados obtenidos por las distintas técnicas, y a su vez se correlacionaban con la clínica de los pacientes. Un 42% de las muestras fueron positivas para ANA y positivas para los ENAs por alguno de los métodos de ELISA, siendo los resultados discordantes entre las distintas técnicas. En este último caso la presencia y/o el tipo específico de autoanticuerpo de ENA no siempre tenía correlación con los síntomas clínicos de los pacientes. En otro 27% no coincidieron los resultados obtenidos por Inmunodot con los obtenidos por las técnicas de ELISA, en la que fueron negativos para todos los ENAs.

En la Tabla III se reflejan las frecuencias obtenidas para cada ENA por cada una de las técnicas utilizadas. Los anticuerpos detectados con más frecuencia fueron los anti-SS-A (38-61%), seguido de los anti-SS-B (15-35%), anti-RNP (13-23%) y anti-Sm (4-27%). Los autoanticuerpos menos frecuentes fueron frente a Scl-70 (8-19%) y Jo-1 (0-13%).

La concordancia entre las técnicas de ELISA evaluadas fue de un 88% (ELISA-1 vs -2), 73% (ELISA-1 vs -3) y 73% (ELISA-2 vs -3) y la de los métodos de ELISA frente el método de Inmunodot fue de un 38%, 42% y 27% (vs los ELISA-1, -2 y -3, respectivamente).

CONCLUSIONES

La detección de autoanticuerpos específicos para las enfermedades autoinmunes sistémicas puede ser de ayuda

TABLA II. Datos clínicos y resultados de las muestras con discrepancia en los resultados obtenidos por los distintos métodos

Muestra	Patrón y Título ANA ^a	Antígenos positivos por				Diagnóstico o clínica
		Inmunodot	ELISA 1 ^b	ELISA 2 ^c	ELISA 3 ^d	
1	Negativo	Ro, Scl-70	Negativo	Negativo	Negativo	Fenómeno de Raynaud
2	P 1/80	Ro	Ro	Ro	Ro, La	SS
3	M 1/640	Ro	Ro, La	Ro, La	Ro, La	LES, SS
4	M 1/320	Sm-RNP, Sm	Sm-RNP	Sm-RNP, Sm	Sm-RNP, Sm	Nefropatía Lúpica
5	Negativo	Ro, La	Negativo	Negativo	Negativo	SS
6	M 1/320	Ro, La, Sm-RNP	Ro, La	Ro, La	Ro, La	LES, SS
7	Negativo	La	Negativo	Negativo	Negativo	Meniscopatica Gonartrosis
8	Negativo	Ro	Negativo	Negativo	Negativo	
9	P 1/80	Ro	Ro	Ro	Ro, La	Hipotiroidismo subclínico
10	Negativo	jo-1	Negativo	Negativo	Negativo	Areactiva
11	Negativo	Sm/RNP	Negativo	Negativo	Negativo	Fenómeno Raynaud
12	M >1/640	Scl-70, Sm-RNP, Sm	Sm-RNP, Sm	Sm-RNP, Sm	Sm-RNP	Poliartralgias Mixtas, Artritis
13	Negativo	Jo-1	Jo-1	Jo-1	Negativo	Carcinoma de endometrio. Lesiones líticas
14	P 1/80	Ro, La	Ro	Ro	Ro	Sospecha BehCet/fibromialgia
15	M >640	Sm-RNP, Sm	Sm-RNP	Sm-RNP	Sm-RNP	LES
16	P 1/80	Ro, La	Negativo	Ro	Ro	Tiroiditis crónica atrófica autoinmune
17	P 1/80	Sm	Sm	Sm		Esclerosis sistémica.
18	M >1/640	Ro, La, Sm, Scl70	Sm	Sm-RNP, Sm	Sm-RNP	Sospecha conectivopatía (Lupus Vs Esclerodermia Vs EMTC
19	Negativo	Ro/La/Sm/RNP/Jo	Negativo	Negativo	Negativo	Actualmente descartada polineuropatía
20	H >1/640	Ro, La	Ro	Ro	Ro	LES
21	P 1/80	Ro	Ro	Ro	Ro	LES, SS
22	M 1/160	Ro/La	Ro/La	Ro/La	Ro/La	SS, AR
23	M 1/320	Ro	Ro	Ro	Ro	SS
24	M 1/160	Ro/La	Ro/La	Ro/La	Ro/La	SS, EM
25	P 1/80	Scl-70	Scl-70	Scl-70	Scl-70	Esclerodermia
26	P 1/80	Scl-70	Scl-70	Scl-70	Scl-70	

^aP: Positivo; H: Homogéneo; M: Moteado; ^bELISA 1: Labotec; ^cELISA 2: Alegría; ^dELISA 3: Pharmacia.

en el diagnóstico (Sm en el Lupus), de interés en el pronóstico (Scl 70 en Esclerodermia) o de interés como criterio de clasificación (RNP en la Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo)⁽²⁾. En la población general, la prevalencia de enfermedades reumáticas sistémicas es baja (1% artritis reumatoide, 0,5% el resto)⁽²⁾, y los resultados positivos para ANAs y anti-ENA tienen un bajo valor predictivo positivo como pruebas de cribado⁽⁷⁾. Por ello, el uso de métodos altamente específicos para la detección de anti-ENA puede aumentar el valor predictivo positivo y, por tanto, la utilidad clínica del test.

Nuestros resultados muestran que las técnicas ELISA fueron más concordantes entre sí para la detección de autoanticuerpos anti-ENA, que por el método de Inmunodot,

y que, además, se correlacionan con los síntomas clínicos y el patrón ANA del paciente.

En los casos en que por IFI se obtuvo un resultado negativo, éste también se correspondía con un resultado negativo de ENAs por las técnicas de ELISA, mientras que por Inmunodot encontramos resultados positivos para alguno de los ENAs. Sólo en un caso se obtuvo un resultado de IFI negativo con resultado positivo para alguno de los ENAs (Jo-1) por las técnicas de ELISA-1 y -2 y por la técnica de Inmunodot.

Sabemos que los resultados positivos de IFI sobre células Hep-2 están asociados tanto con enfermedades del tejido conectivo como con enfermedades distintas a las conectivopatías, las cuales pueden ser autoinmunes o no autoinmunes. Sin embargo, los pacientes con conectivopatías se destacan del

TABLA III. Frecuencia de cada ENA identificado

Número (%) de muestras de cada ENA identificado por*				
ENA	Inmunodot	ELISA 1	ELISA 2	ELISA 3
SSS-A	16 (61)	10 (38)	11 (42)	11 (42)
SS-B	9 (35)	4 (15)	4 (15)	6 (23)
RNP	6 (23)	3 (13)	3 (13)	3 (13)
Sm	7 (27)	3 (13)	4 (15)	1 (4)
Jo-1	3 (13)	1 (4)	1 (4)	0
Scl-70	5 (19)	2 (8)	2 (8)	2 (8)

*Número total de muestras: 26. Porcentaje del total entre paréntesis.

resto por el mayor grado de intensidad de fluorescencia. No obstante, para identificar el perfil de anticuerpos específicos o para confirmar un resultado positivo por IFI, siempre que éste no se corresponda con la clínica del paciente, se emplean métodos adicionales como son el Inmunodot y ELISA. Esto es debido a que hay que considerar también la posibilidad de que en el organismo se generen anticuerpos por mecanismos, generalmente infecciosos, que por mimetismo molecular den reacción cruzada con antígenos propios. Éstos podrían ser detectados por IFI empleando un conjugado anti-inmunoglobulina humana total y no en aquellos inmunoensayos, que emplean conjugados anti-IgG humana más específicos, como ocurre en las técnicas de ELISA e Inmunodot.

Los resultados también muestran que la presencia y/o el tipo específico de autoanticuerpo de ENA no siempre tienen correlación con la presentación clínica del paciente, sobre todo cuando existen discrepancias entre los resultados obtenidos por las distintas técnicas.

La discrepancia en los resultados entre las distintas técnicas realizadas muestra que cada una de ellas tiene una sensibilidad y especificidad que depende del autoanticuerpo a detectar, así como de la presencia de otros autoanticuerpos, y del tipo y la naturaleza del antígeno (recombinante, nativo, humano, bovino) que se utilice para la detección. Independientemente de la estrategia empleada por cada laboratorio para la detección de autoanticuerpos frente a los ENAS, la comunicación con el personal clínico en cuanto a la importancia de un resultado positivo es imperativa. El laboratorio y el clínico deben ser conscientes de la sensibilidad y la especificidad de cada método empleado en el laboratorio clínico.

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a la Dra. Dosdá por su apoyo y por sus directrices en el campo de la Inmunología.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

CORRESPONDENCIA:

Natividad López Riquelme
Hospital General Universitario de Elche
Camí de l'Almazara 11
03203 Elche (Alicante)
Tlf: 966616128. Fax: 966616128
E-mail: sagona@terra.es

BIBLIOGRAFÍA

1. Phan TG, Wong RCW, Adelstein S. Autoantibodies to Extractable Nuclear Antigens: Making detection and interpretation more meaningful. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002;9:1-7.
2. Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al. Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic disease. *Am J Clin Pathol* 2002;117:316-324.
3. Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon D, Homburger H. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:71-81.
4. Lock R, Unsworth D. Antibodies to extractable nuclear antigens. Has technological drift affected clinical interpretation? *J Clin Pathol* 2001;54:187-190.
5. Kurata N, Tan EM. Identification of antibodies to nuclear acidic antigens by counterimmunoelectrophoresis. *Arthritis Rheum* 1956; 19:574-580.
6. Von Mühlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995;24:323-358.
7. Slater C, Davis R, Shmerling R. Antinuclear antibody testing. A study of clinical utility. *Arch Intern Med* 1996;156:1421-1425.