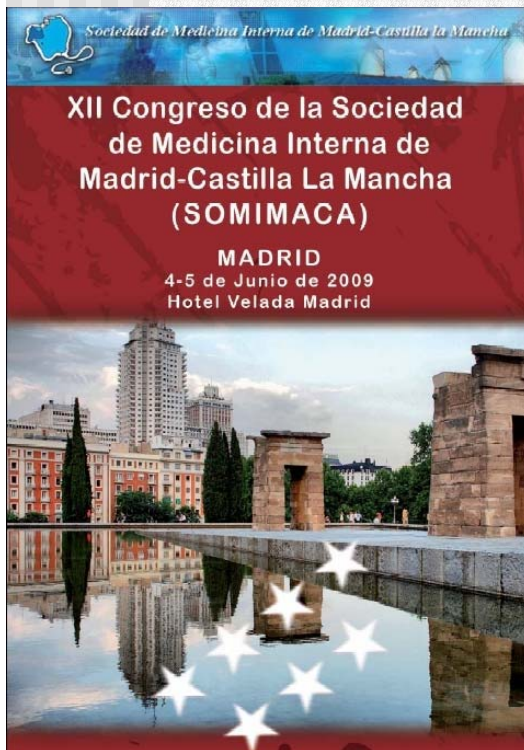


# De la serología a la enfermedad. Papel diagnóstico y pronóstico del laboratorio en las enfermedades autoinmunes

Norberto Ortego Centeno



# Algunas máximas

---

- Las enfermedades autoinmunes son un grupo heterogéneo de patologías caracterizadas por la presencia de una **respuesta inmune** humoral y/o celular **contra lo propio**.
- Esta respuesta inmune la podemos poner de manifiesto a través de una **gran variedad** de pruebas de **laboratorio**

# Pruebas inmunológicas más comunes utilizadas en el estudio de laboratorio de las enfermedades autoinmunes

---

## ■ ANA

- Antihistonas
- Anti-DNA
- Anti-ENA
  - Anti-Ro (SS-A)
  - Anti-La (SS-B)
  - Anti-RNP
  - Anti-Sm
  - Antitopoisomerasa I (Scl-70)
- Anticentrómero

# Pruebas inmunológicas más comunes utilizadas en el estudio de laboratorio de las enfermedades autoinmunes

---

- Factor reumatoide
- Complemento
- Crioglobulinas
- Anticuerpos antifosfolípidicos
- Anticuerpos anti citoplasma de neutrófilos (ANCA)

# Alguna máximas

---

## DIAGNÓSTICO

- El diagnóstico de las enfermedades autoinmunes sistémicas **comienza por la clínica**
- El **laboratorio** es una **ayuda**
- **Sin lógica** el laboratorio puede **confundir** más que ayudar

# Alguna máximas

- “Un test diagnóstico adecuado es aquel que se solicita para **responder** a una **pregunta** clínica **clara**. Su **resultado** permitirá al clínico emprender una **acción** encaminada a obtener un **beneficio** en la salud del **paciente**”

# Algunas máximas

---

## DIAGNÓSTICO

- Las **enfermedades autoinmunes** suelen asociarse con Ac contra proteínas intracelulares y ácidos nucleicos (**ANA**)
- Se denominan ANA, pero **a veces** son antígenos **citoplasmáticos**
- EL **ESTUDIO** DE UNA SUPUESTA ENFERMEDAD AUTOINMUNE **SE SUELE INICIAR** CON LA DETERMINACIÓN DE **ANA**

# Algunas máximas

---

- Los anticuerpos pueden ser o no patogénicos, pero...
- en muchas ocasiones son **marcadores** de la enfermedad



# Algunas máximas

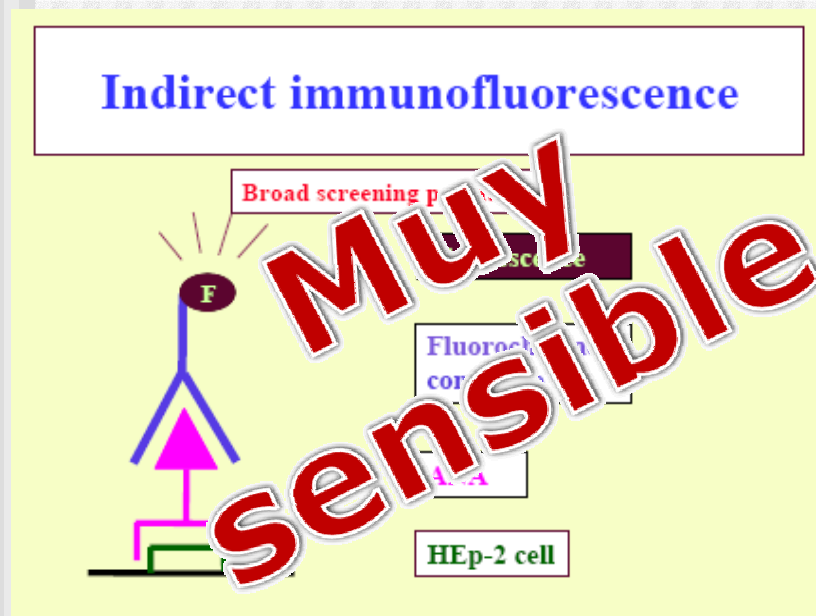
---

La detección de autoanticuerpos es útil:

- En el **diagnóstico**
- La **clasificación**
- El **pronóstico**
- La **monitorización** de la enfermedad
- La instauración de un **tratamiento**

# ¿Cómo empezar el estudio?

- La realización de una **IFI**, utilizando células **Hep-2** como sustrato, ha sido el **comienzo clásico**

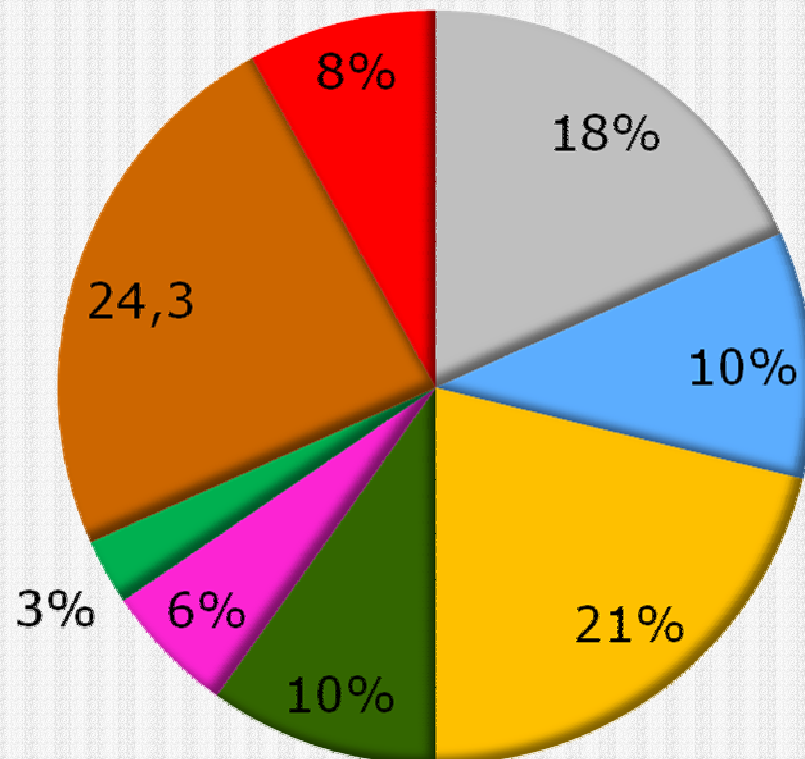


- Expresa Ag presentes en todas las fases del ciclo celular, permite identificar Ac que solo se dirigen contra Ag humanos
- El sustrato humano **aumenta la sensibilidad**, sobre todo para **centrómero, Ro/SSA y Jo-1:**

# Anticuerpos antinucleares

- La presencia de ANA es inespecífica

DIAGNÓSTICO



- LES 18,8%
- Lupus inducido 10,9%
- Otras autoinmunes 21,7%
- Tiroiditis autoinmune 10,1%
- Enf organoespecíficas 5,8%
- Neoplasias 2,9%
- Otras o desconocido 24,3%
- Infecciones 8,3%

Shiel WC J Rheumatol 1989; 16: 782

# Anticuerpos antinucleares

- La IFI nos da más información:

Título

Patrón

# Titulación

---

- Normalmente se hace en función de la **última dilución** a la que son **positivos** los **ANA**.
- Si hay más de un patrón se pueden dar dos positividades

# Título

---

DIAGNÓSTICO

- Se considera dos puntos de corte:

$< 1/40$

Se considera **negativos**

$\geq 1/40$  y  $\leq 160$

Se consideran **positivos débiles**. El paciente debe hacer seguimiento clínico


$> 1/160$

Se consideran **positivos** y Debe proseguirse el estudio

Cada laboratorio debería establecer su propio punto de corte

# Situaciones que cursan con ANA(+) en función de los títulos

DIAGNÓSTICO

1/1280	LES
	Enfermedad Mixta del Tejido Conectivo
	Artritis Reumatoide
	Esclerodermia
	Hepatitis crónica activa
	Síndrome de Sjögren
	Polimiositis
	Neoplasias (linfoma)
	VIH
	Infecciones bacterianas
	Anticoncepción oral / Beta bloqueantes
1/40	Edad avanzada

# Título

Puede ser **negativos** por:

1. **Ausencia** real
2. Anticuerpos contra **antígenos muy solubles** (Ro)
3. Acs contra Acs citoplasmáticos de **escasa concentración** (Jo-1 y Ro)



# Patrón

---

- El **patrón** de IF solo tiene un **valor orientativo**
- Se han descrito unos 40 patrones.
- Solo 19 tienen un cuadro clínico razonablemente asociado

**Table 2. Antinuclear antibody patterns and associated diseases<sup>a</sup>**

<b>Antinuclear antibody pattern</b>	<b>Associated antigen</b>	<b>Associated disease</b>
Homogeneous	DNA histone complex (ribonucleoprotein, nucleosome)	SLE, drug-induced lupus, other diseases
Peripheral/rim	DNA, nuclear envelope antigens	SLE, autoimmune hepatitis
Speckled	Smith, RNP, SS-A, SS-B, Scl-70, centromere, RNA polymerase II and III	SLE, MCTD, Sjögren, PSS, other diseases
Nucleolar	Nucleolar RNA, RNA polymerase I	Diffuse systemic sclerosis, hepatocellular carcinoma
Centromeric	Centromeres	Limited cutaneous systemic sclerosis

<sup>a</sup>SLE, systemic lupus erythematosus; MCTD, mixed connective tissue disease; PSS, progressive systemic sclerosis.

# Sobre patrones

---

- **Salvo** el patrón **anti-centrómero**, la **relevancia clínica** de los diferentes patrones es **limitada** y hace falta un estudio ulterior para definir la **especificidad antigénica**

# Determinación de autoanticuerpos

DIAGNÓSTICO

- Con el objetivo de identificar **anticuerpos específicos**, se han desarrollado diferentes técnicas en las que se utilizan **antígenos recombinantes** o altamente **purificados**

<b>Métodos inmunoquímicos</b>	<b>Métodos inmunométricos</b>
Inmunofluorescencia indirecta Fijación de complemento Aglutinación pasiva Inmunodifusión Contrainmunolectroforesis Inmunoprecipitación Inmunoblot Inmunodot	Radioinmunoensayo (RIA) Ensayo inmunoenzimático (ELISA) Fluoroinmunoensayo (FIA) Inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA)
<b>Cualitativas</b>	<b>Cuantitativas</b>

# Determinación de autoanticuerpos

DIAGNÓSTICO

- Con el objetivo de identificar **anticuerpos específicos**, se han desarrollado diferentes técnicas en las que se utilizan **antígenos recombinantes** o **altamente purificados**

<b>Métodos inmunoquímicos</b>	<b>Métodos inmunométricos</b>
Inmunofluorescencia indirecta Fijación de complemento Aglutinación pasiva Inmunodifusión Contrainmunolectroforesis Inmunoprecipitación Inmunoblot Inmunodot	Radioinmunoensayo (RIA) <b>Ensayo inmunoenzimático (ELISA)</b> Fluoroinmunoensayo (FIA) Inmunoensayo quimioluminiscente (CLIA)
<b>Cualitativas</b>	<b>Cuantitativas</b>

# Enzyme-Linked Immunoabsorvent Assay

DIAGNÓSTICO

- Técnica muy **sensible, específica y cuantitativa**
- Se basa en la unión de **antígeno (muy purificados)** con un anticuerpo conjugado a un enzima
- Un sustrato cromógeno. Produce color

# ELISA

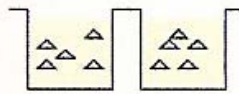
Métodos de detección de autoanticuerpos

Ag

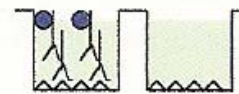
Suero  
Ac IgG?

Conjugado  
Anti IgG Enz\*

1



4



2



5

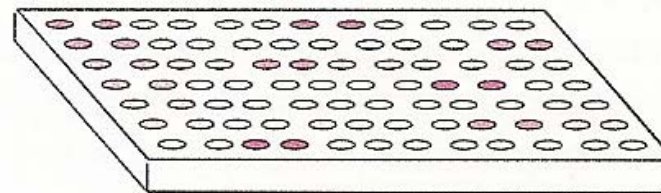


Positivo    Negativo

3



6



Substrato  
Cromógeno  
Fluorógeno  
Quimiolumin

Reacción  
Enzimática  
Coloreada

Lectura  
450nM  
Absorbancia

# ELISA

- Las técnicas de **ELISA** pueden usar Ag altamente purificados para medir **anticuerpos específicos**
- O mezclas de Ag nativo (no purificado) para pruebas de **detección de ANA**
- Se van a utilizar como **cribado** de ANA
- Tienen la **ventaja** de la **rapidez** pero **deben validarse** con muestras de enfermos bien conocidas.



# TRITURUS

DIAGNÓSTICO



# Placa de ELISA

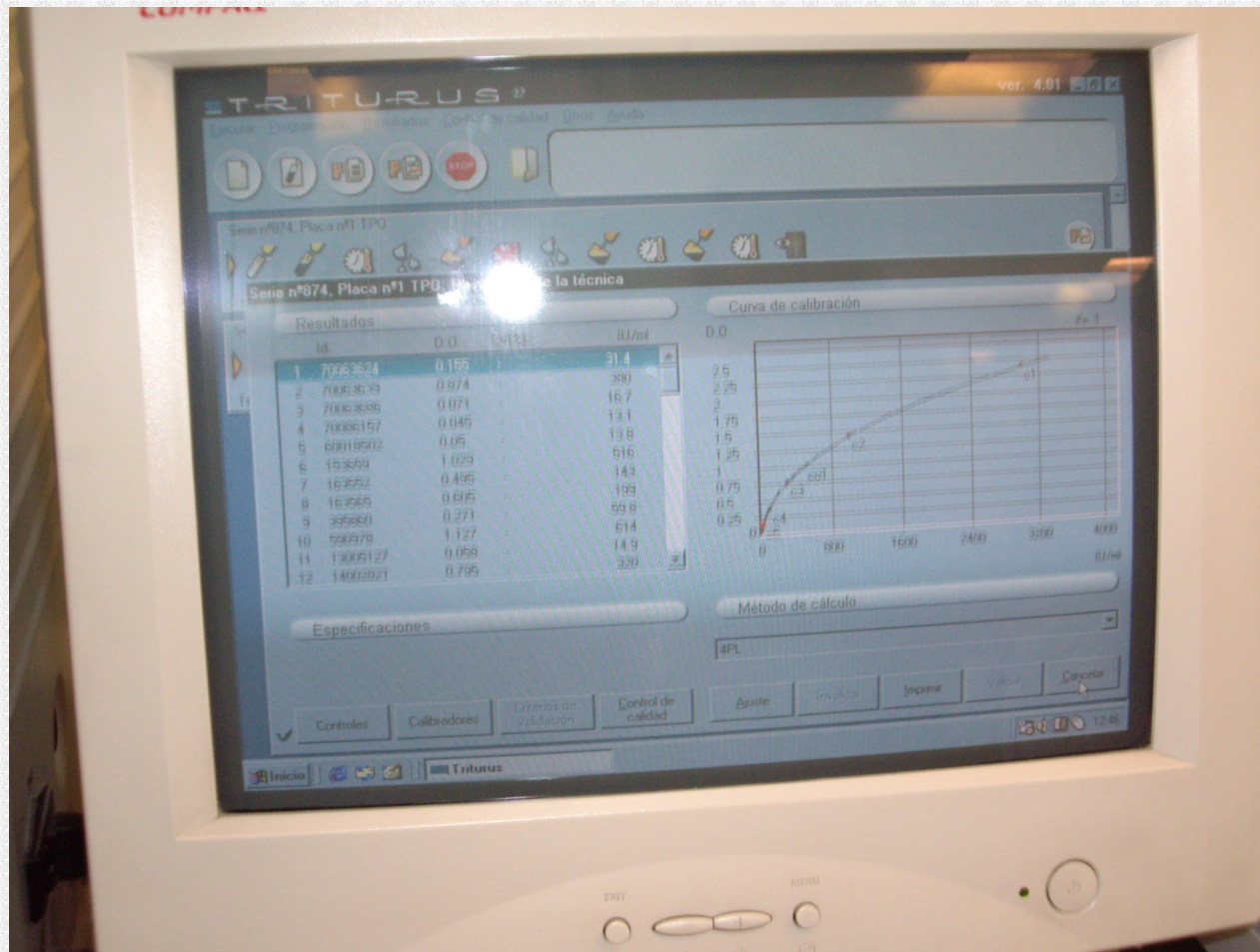
DIAGNÓSTICO



- Son 96 pocillos (8x12).
- En los primeros 8: curva de calibración y control alto y control bajo.
- En el resto de pocillos (80) están las muestras

# Lectura y curvas

DIAGNÓSTICO



# Métodos enzimáticos

DIAGNÓSTICO

- Una **prueba negativa** con ELISA **no** implica **ANA negativos**
- Una **prueba positiva**, siempre debe validarse mediante **IFI**
- Una prueba **positiva**, con **IFI negativa**, se considera un **falso positivo salvo** que se encuentre un **anti-Ro o anti-Jo1**
- Siempre valorar con la **clínica**

# Un ejemplo

84 años



DIAGNÓSTICO

IgG SUERO	658,00 *mg/dL	(725,00-1900,00)
IgA SUERO	36 * mg/dL	(50-340)
IgM SUERO	157 mg/dL	(45-280)



# Un ejemplo

84 años



DIAGNÓSTICO

IgG SUERO	658,00 *mg/dL	(725,00-1900,00)
IgA SUERO	36 * mg/dL	(50-340)
IgM SUERO	157 mg/dL	(45-280)
FACTOR REUMATOIDE	<9,44 UI/mL	(<15,01)
C3 SUERO	110,00 mg/dL	(75,00-135,00)
C4 SUERO	1,40 * mg/dL	(14,00-60,00)
C1 INHIBIDOR	3,04 * mg/dL	(16,00-33,00)
C1 INHIBIDOR FUNCIONAL	12,45 * %	(>50,00)
C1q	No se detecta	

	Hereditario Tipo I	Hereditario Tipo II	Adquirido Tipo I	Adquirido Tipo II
CH-50	↓	↓	↓	↓
C1q	normal	normal	↓	↓
C2	↓	↓	↓	↓
C4	↓	↓	↓	↓
C1 inh niveles	↓	↑	↓	↓
C1 inh función	↓	↓	↓	↓
C1 inh biosíntesis	↓	anormal	normal	normal
Anticuerpos anti-inhibidor de C1	-	-	-	+

# Un ejemplo

## DIAGNÓSTICO

### AUTOINMUNIDAD

### HOSPITAL SAN CECILIO

AC. ANTINUCLEAR SCREENING	0.23		[ 0 - 1 ]
AC. ANTI ENAS LA /SSB	4	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS RO /SSA	* 273	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS SM	6	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS SM /RNP	11	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS SCL-70	4	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS JO 1	31	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI DNA NATIVO	7	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI. CENTROMERO B	3	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANA IFI	1/160 GRANULAR		
HYSTONAS	49	U/ml	[ 0 - 120 ]

# Un ejemplo

84 años



DIAGNÓSTICO

IgG SUERO	658,00 *mg/dL	(725,00-1900,00)
IgA SUERO	36 * mg/dL	(50-340)
IgM SUERO	157 mg/dL	(45-280)
FACTOR REUMATOIDE	<9,44 UI/mL	(<15,01)
C3 SUERO	110,00 mg/dL	(75,00-135,00)
C4 SUERO	1,40 * mg/dL	(14,00-60,00)
C1 INHIBIDOR	3,04 * mg/dL	(16,00-33,00)
C1 INHIBIDOR FUNCIONAL	12,45 * %	(>50,00)
C1q	No se detecta	

	Hereditario Tipo I	Hereditario Tipo II	Adquirido Tipo I	Adquirido Tipo II
CH-50	↓	↓	↓	↓
C1q	normal	normal	↓	↓
C2	↓	↓	↓	↓
C4	↓	↓	↓	↓
C1 inh niveles	↓	↑	↓	↓
C1 inh función	↓	↓	↓	↓
C1 inh biosíntesis	↓	anormal	normal	normal
Anticuerpos anti-inhibidor de C1	-	-	-	+



# Otro ejemplo

DIAGNÓSTICO

## AUTOINMUNIDAD

## HOSPITAL SAN CECILIO

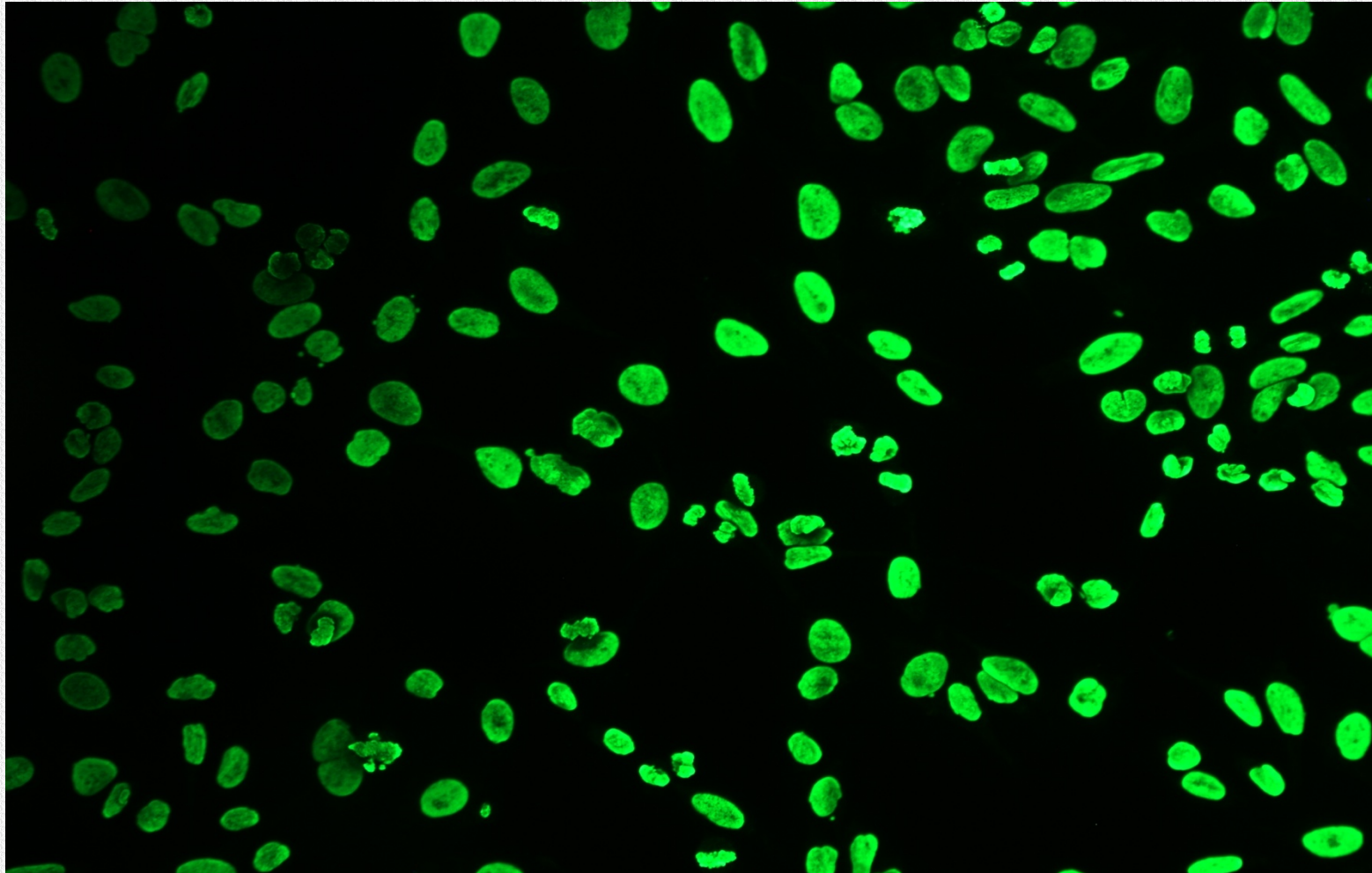
AC. ANTINUCLEAR SCREENING	* 2.5		[ 0 - 1 ]
AC. ANTI ENAS LA /SSB	30	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS RO /SSA	15	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS SM	7	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS SM /RNP	13	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS SCL-70	4	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI ENAS JO 1	31	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI DNA NATIVO	5	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANTI. CENTROMERO B	8	U/ml	[ 0 - 120 ]
AC. ANA IFI	<b>NEGATIVO</b>		
HYSTONAS	31	U/ml	[ 0 - 120 ]

# Microscopio fluorescencia

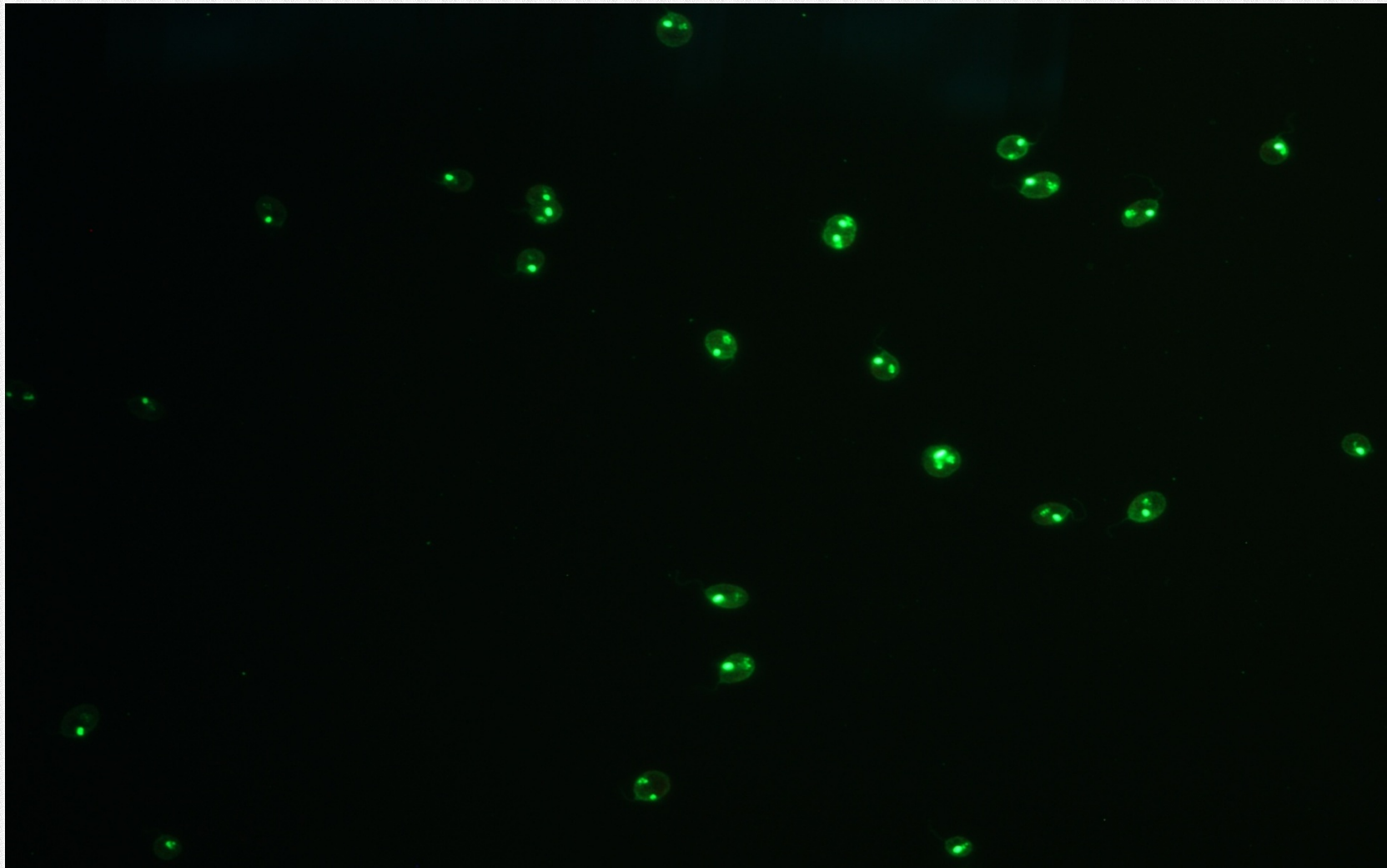


# Homogéneo dsDNA

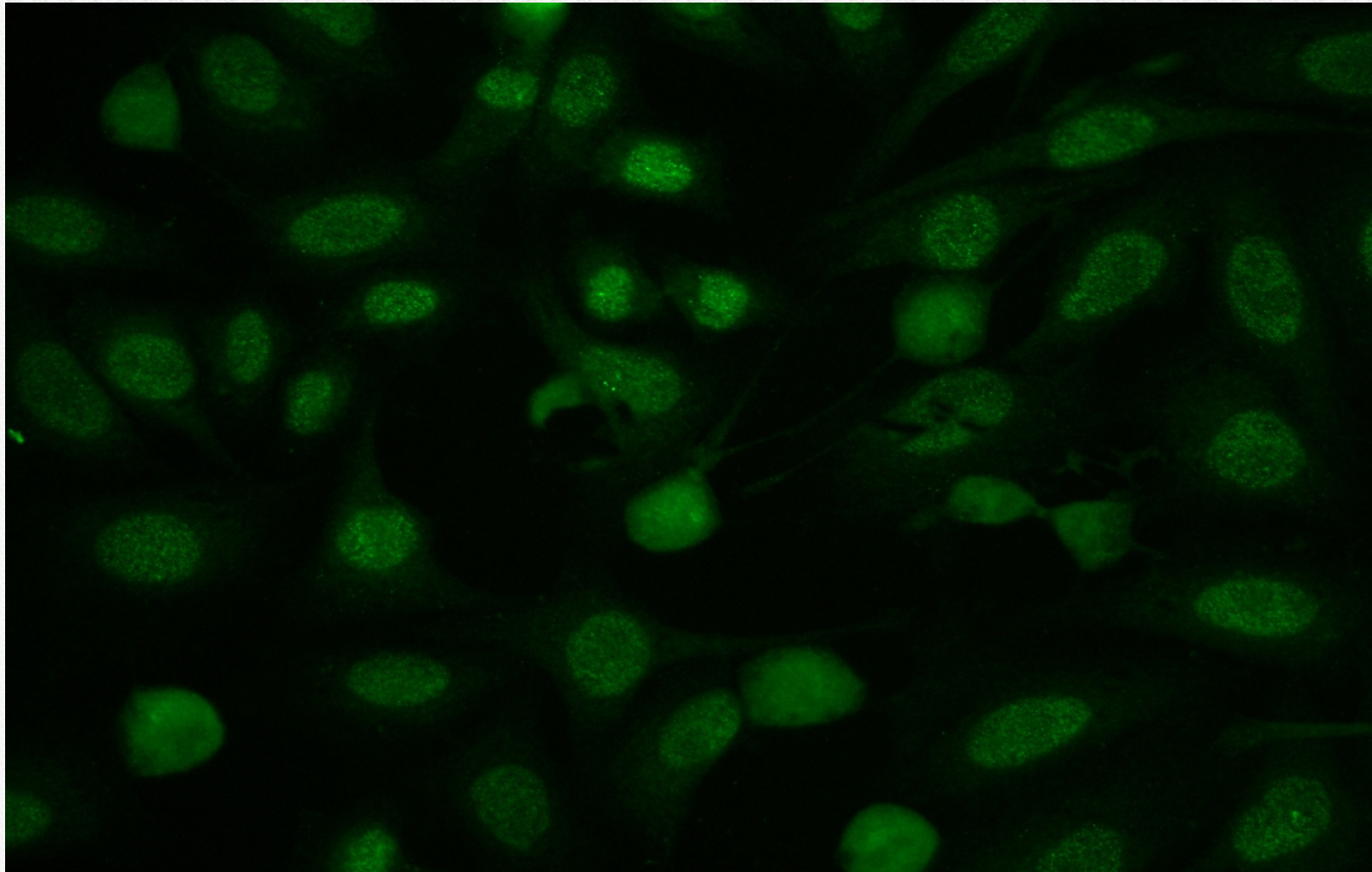
---



# *Crithidia luciliae* dsDNA

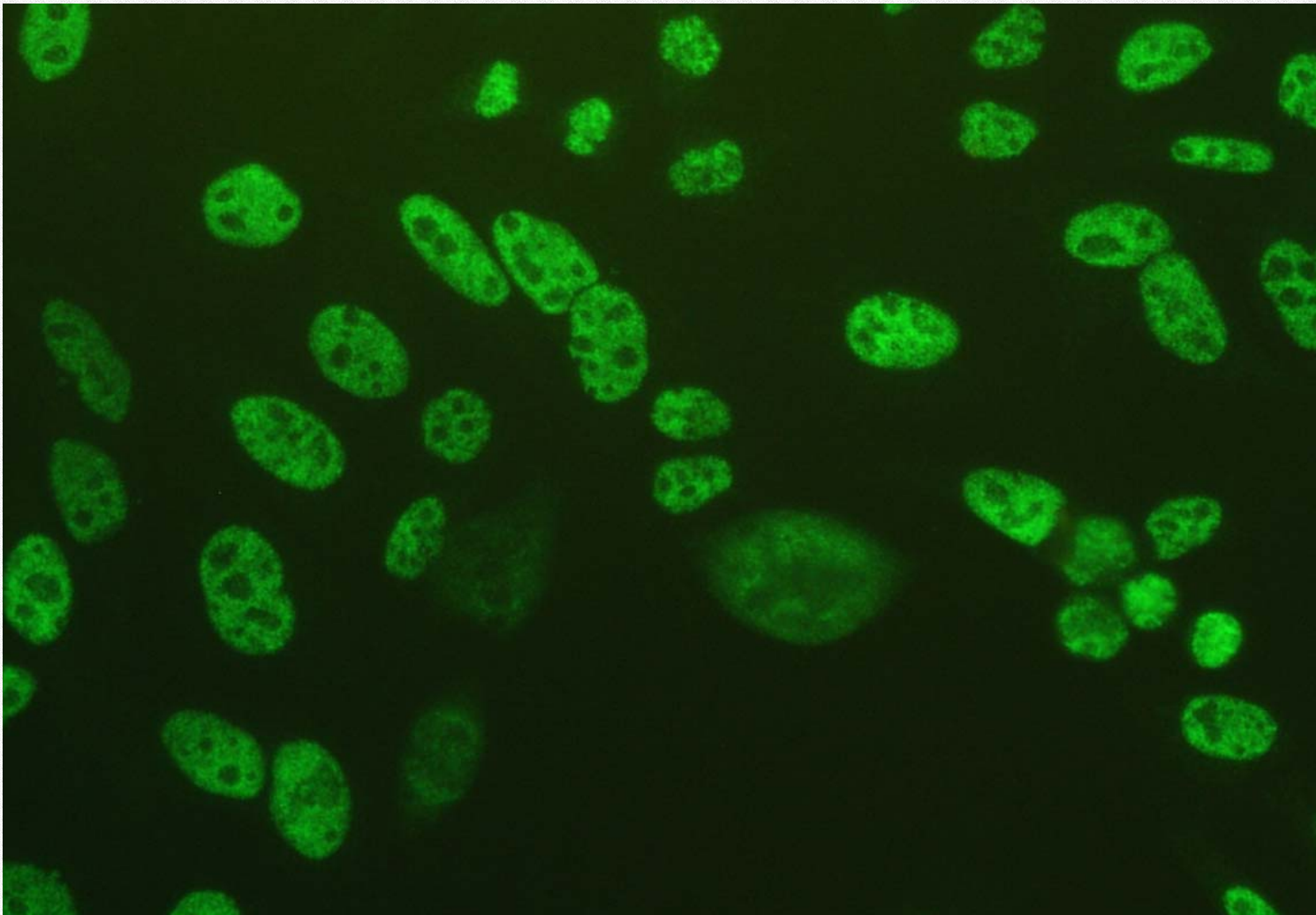


# Moteado anti-La/SSB



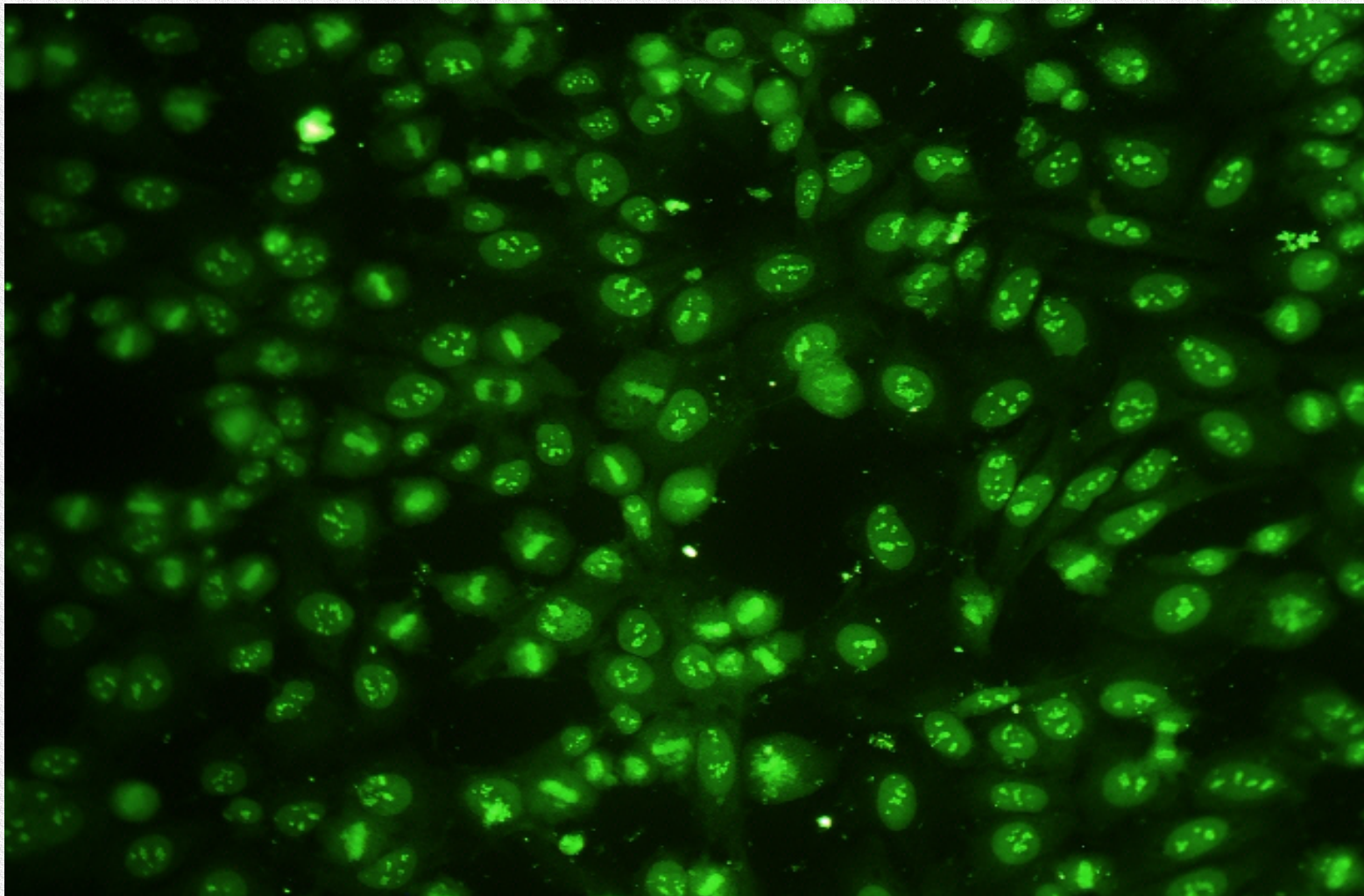
# Moteado anti-RNP

---

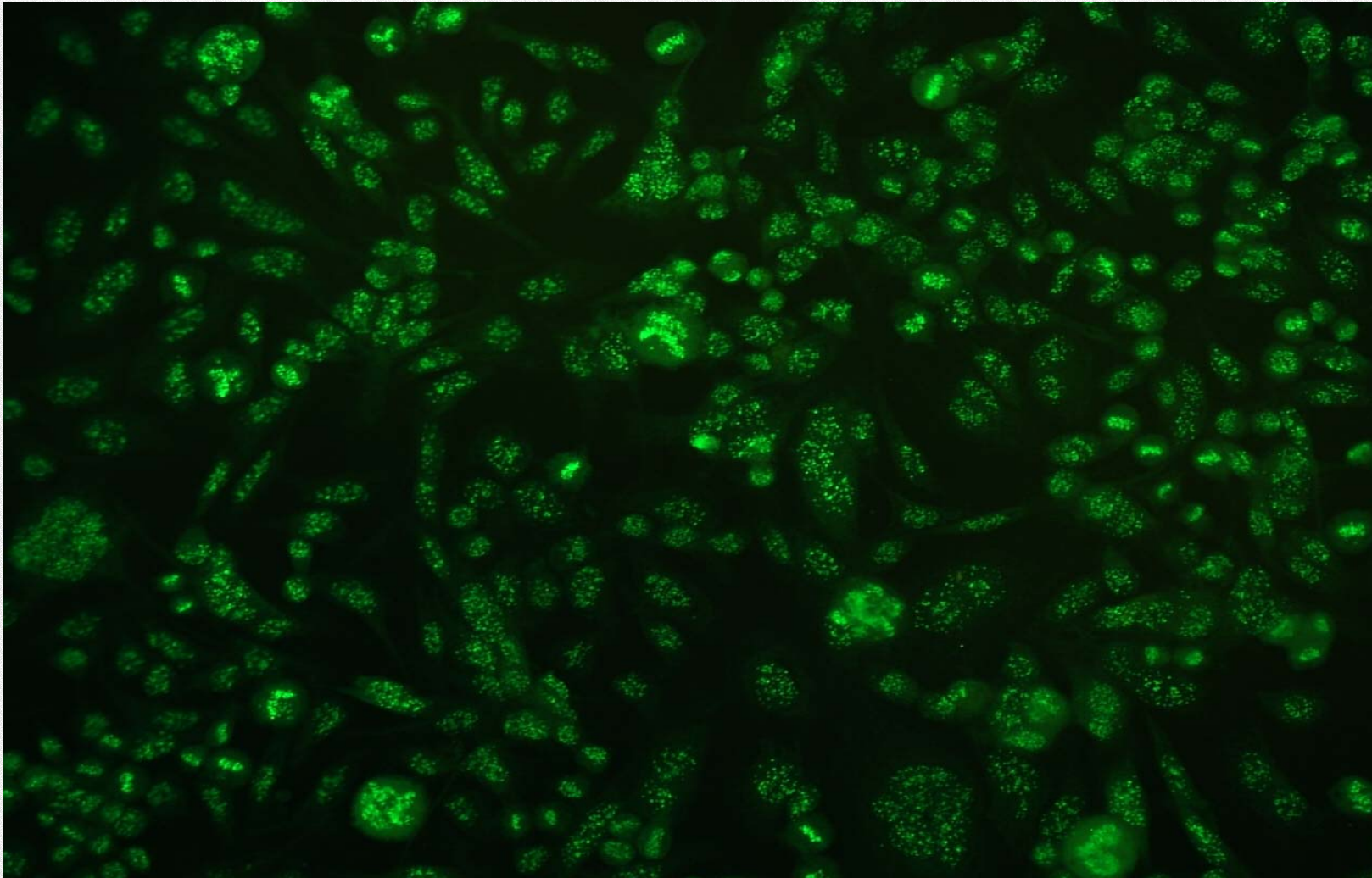


# Nucleolar anti Scl-70

---



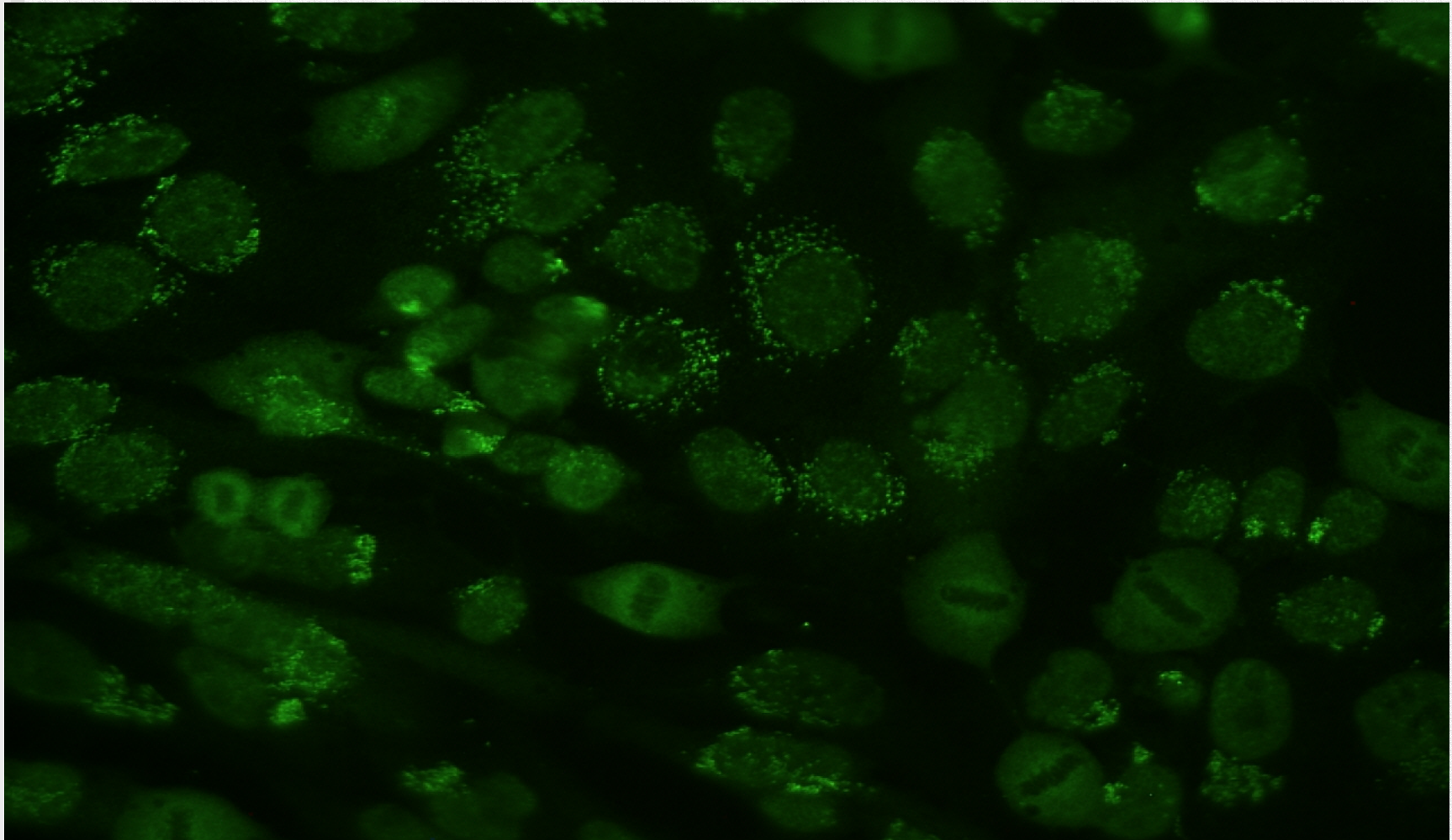
# Anti Centrómero





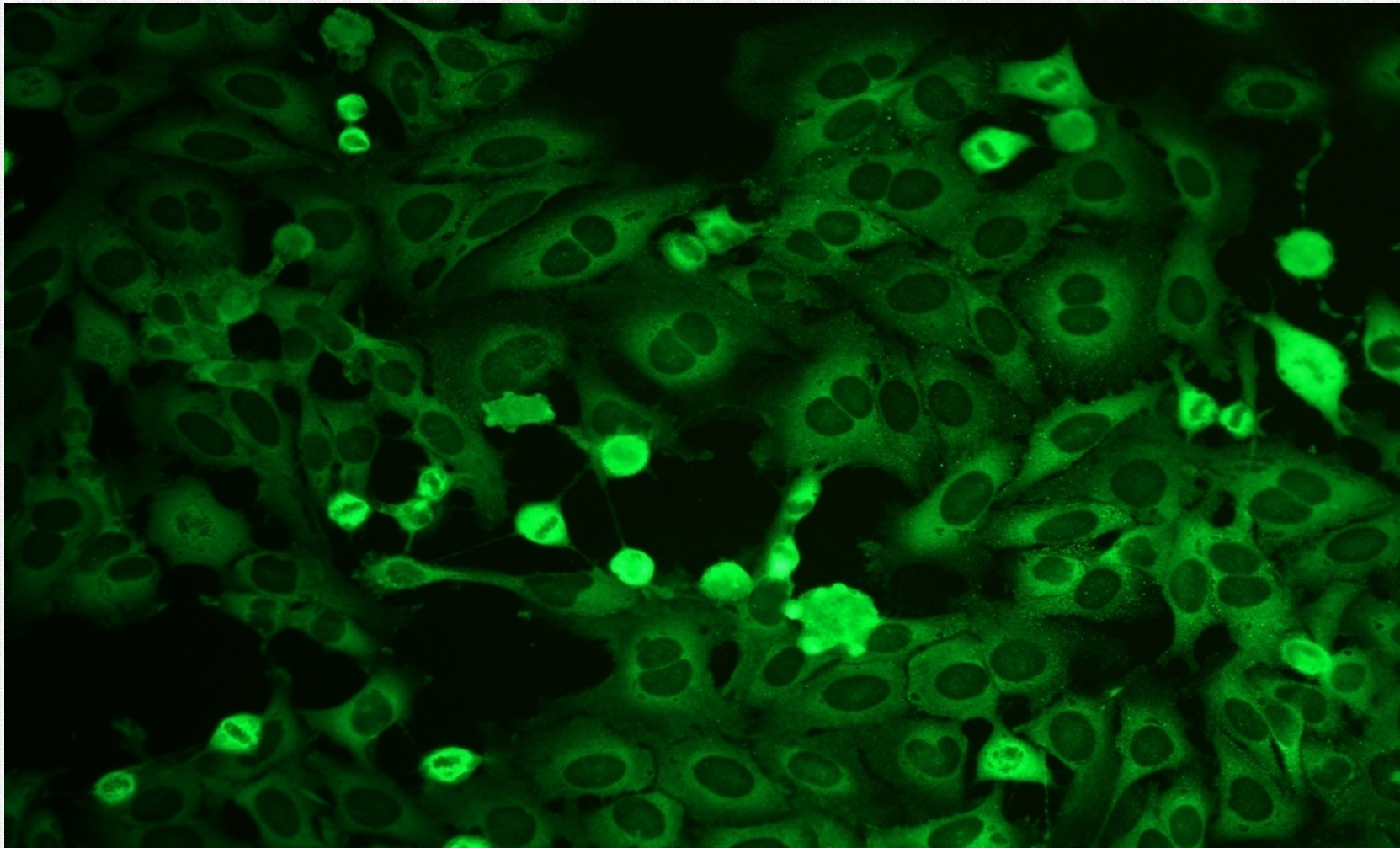
# Aparato Golgi

---



# P Ribosomal

---



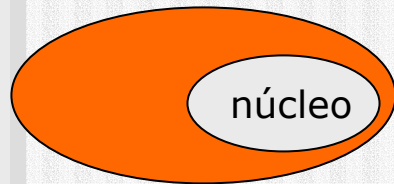
# AtheNA Multi-Lyte System

---

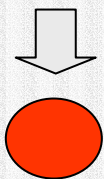
- Basado en tecnología Luminex
- Es un test multiparamétrico (multiplex)
- **Combina ELISA –IFI**
- Determina varios analitos en un pocillo
- Cuantitativo con calibración internas
- Reduce tiempo y volumen

# Métodos multiplexados

Células HEp-2 en cultivo



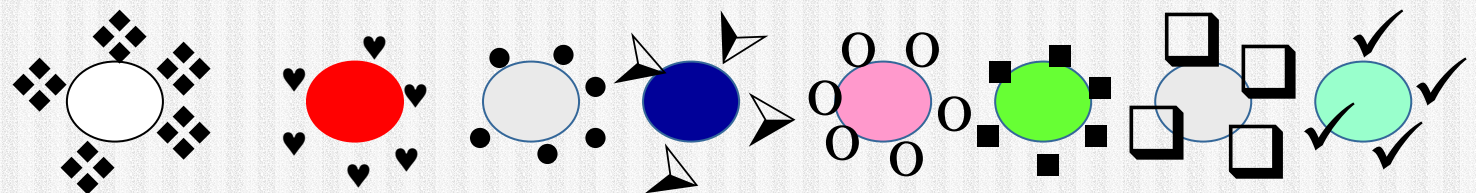
Extracto de antígenos nucleares elaborado para recubrir una partícula (*esfera*)



8 antígenos recombinantes y purificados

- ❖ SS-B
- ♥ SS-A
- Sm/RNP
- Scl-70
- Jo-1
- CENP-B
- HISTONAS
- ✓ dsDNA

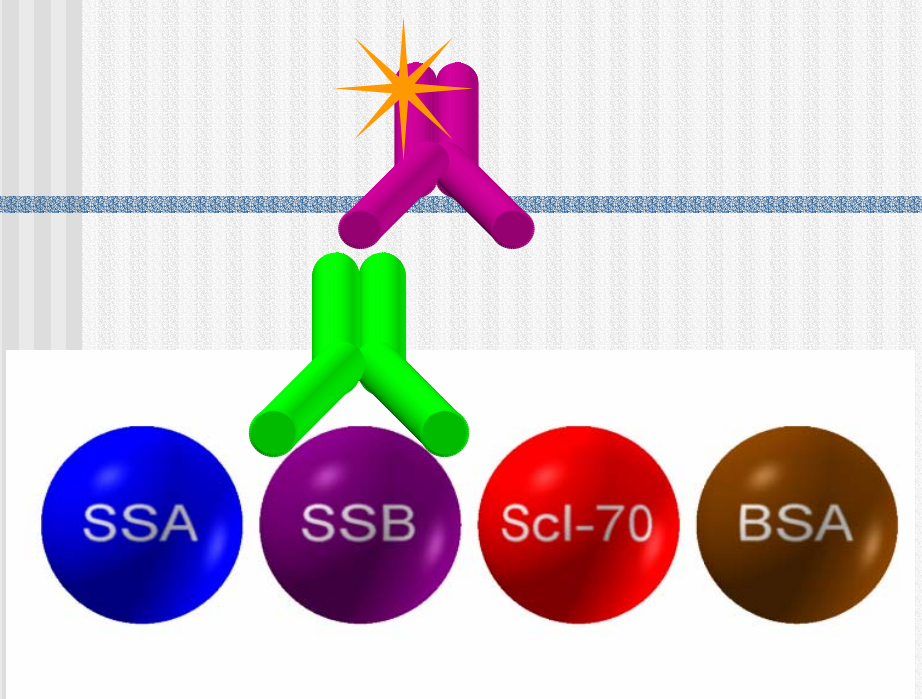
8 *esferas* recubiertas



# Métodos multiplexados

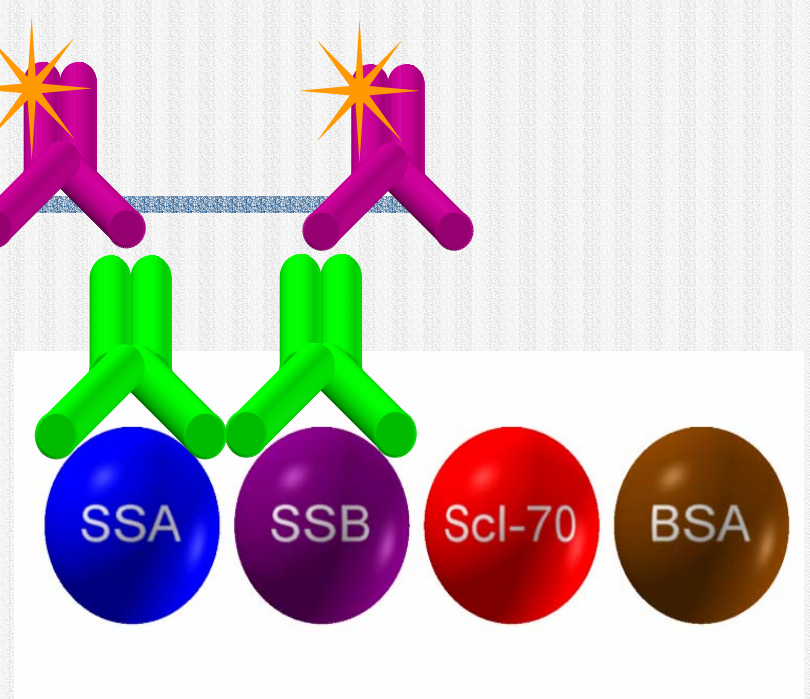
---





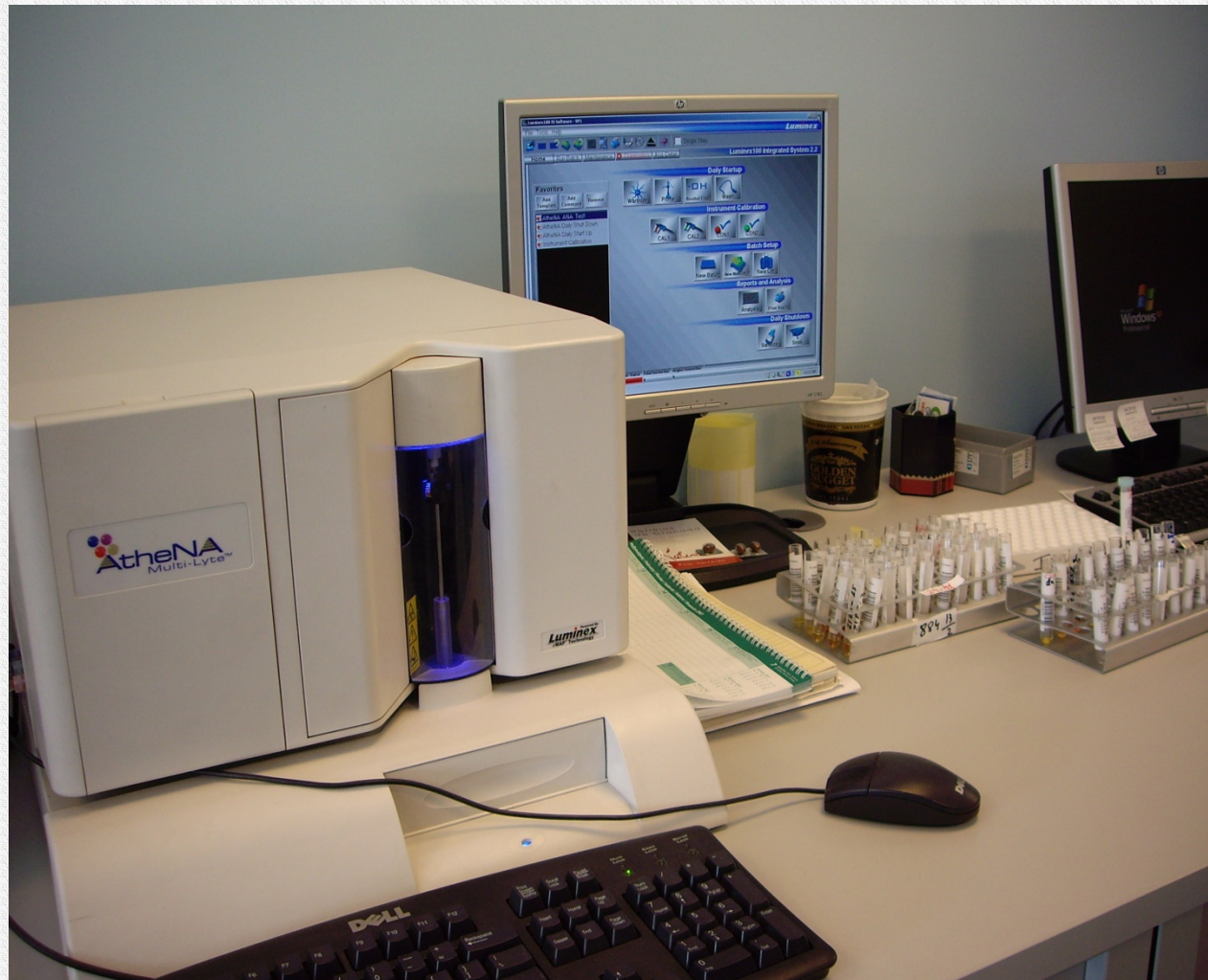
suero con un anticuerpo

el suero del enfermo



suero con dos anticuerpos

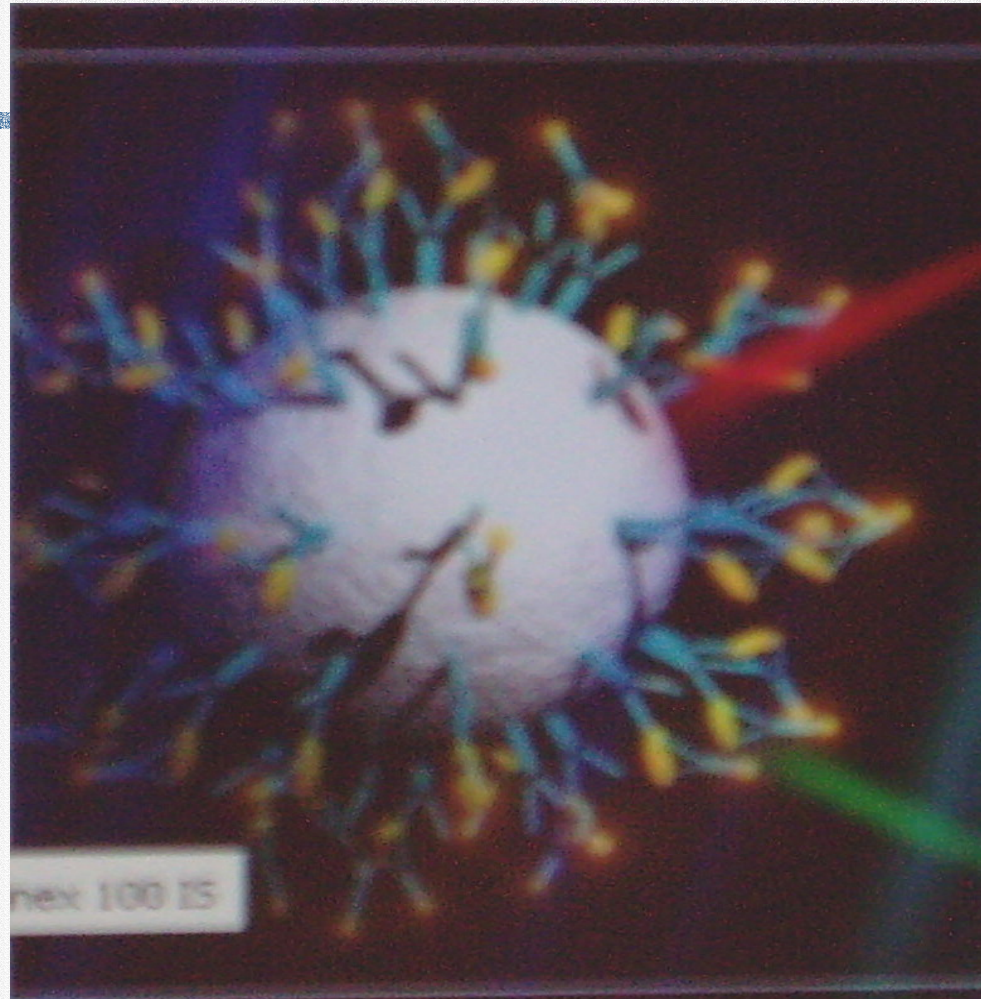
# AtheNA: Citómetro y láser



# ENAS y DNAn

SSA  
SSB  
SM  
RNP  
SCL-70  
JO1  
CENT B  
HISTO  
dsDNA

Suero Ac  
IgG?



anti IgG\*  
Ficoeritrina

Lectura  
Láser



# Anti-DNA

---

DIAGNÓSTICO

- Son un grupo heterogéneo de Igs con diferentes especificidades
- Los más **sensibles** se dirigen contra el DNA de **cadena simple**
- Los más **específicos** se dirigen contra el DNA nativo o de **doble cadena**
- Son un **criterio clasificatorio** de **LES**

# Anti-DNA

---

## PRONÓSTICO

- Los **niveles de anti-DNA** pueden **elevarse** semanas **antes de un brote** y tiene **utilidad** su **monitorización**
- En pacientes poco activos puede hacer anti-DNA cada 6-12 meses y en los más activos cada 6-12 semanas

# Principales ENAs

---

DIAGNÓSTICO

- U<sub>1</sub>RNP      EMTC, LES, Sjögren
- Sm            LES MUY ESPECÍFICOS
- SS-A/Ro      LES, Sjögren
- SS-B/La      LES, Sjögren
- Scl-70        ES
- Jo-1          Síndrome antisintetasa

# Sm

---

## DIAGNÓSTICO

- Reconoce proteínas no histonas unidas a RNA nuclear (snRNA)
- Son **poco sensibles**, pero muy **específicos** del **LES**
- No se modifican con la actividad

# U1-RNP

---

## DIAGNÓSTICO

- Reconoce proteínas no histonas unidas a RNA nuclear (snRNA)
- Son **diagnósticos**, cuando aparecen aislados, y a título alto, de **EMTC**

# Antihistonas

---

DIAGNÓSTICO

- Aparecen en el 95% de los pacientes con **lupus** inducidos por **fármacos**
- También en el LES no inducido

# Anti-Ro/SS-A y anti-La/SS-B

- Proteínas unidas a RNA nuclear
- Aparecen en el 50% de los pacientes con LES
  - ❖ Asociados a fotosensibilidad, neumopatía intersticial y vasculitis cutánea
- Aparecen en el 75% de **Sjögren 1°**
- En el 10-15% del **Sjögren asociado**
- Se relacionan con el **lupus neonatal** y el **bloqueo cardiaco congénito**

# Topoisomerasa o Scl-70

---

- En el 20% de pacientes con **ES**
- **Especificidad** del 100%
- Asociados a neumopatía intersticial y afectación cutánea extensa
- Su presencia multiplica x 63 el riesgo de ES en una persona con Raynaud



# Centrómero

---

- Se asocian a **ES limitada**
- Tienen una sensibilidad baja pero una **especificidad** alta (99,9%)
- Tienen utilidad para descartar ES en un paciente con Raynaud

## U3-RNP (fibrilarina)

---

- En el 12% de **ES**
- **Especificidad alta** (96%)
- Asociados a
  - HP
  - Afectación intestinal
  - Daño renal
  - Afectación cardiaca

# ANA (+) en paciente asintomático

---

PRONÓSTICO



# Anticuerpos como pronóstico

---

PRONÓSTICO

- Los anticuerpos pueden **preceder** en meses, años o décadas al desarrollo de una enfermedad autoinmune, tanto en enfermedades **organoespecíficas** como **sistémicas**

Autorreactividad benigna

*Ruptura de tolerancia*

Autoanticuerpos patogénicos

IgG y mutados somáticamente =  
maduración en centro germinal

dsDNA  
Ro  
La  
Sm  
U1RNP  
...

Depósito tisular de inmunocomplejos

Infiltrado celular y respuesta inflamatoria

Destrucción tisular

**ENFERMEDAD CLÍNICA**

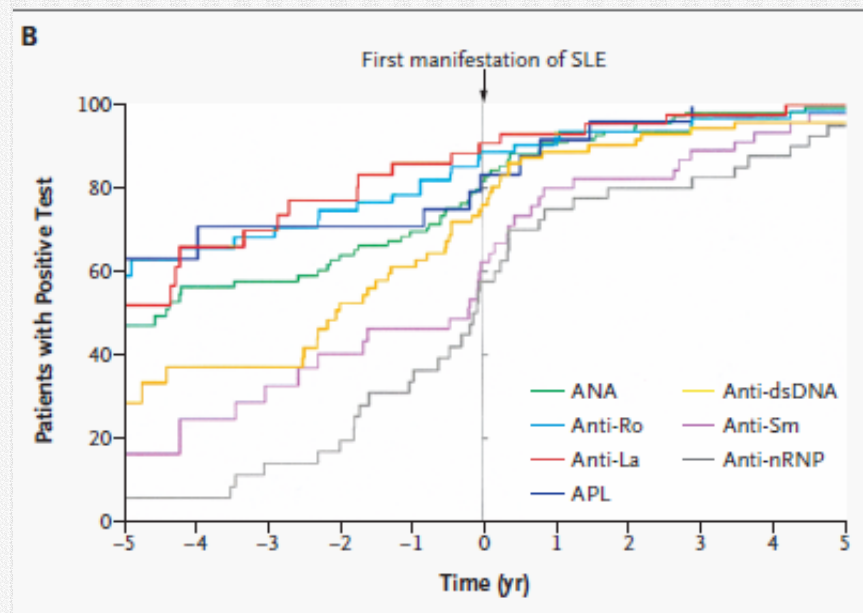
# Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus

Melissa R. Arbuckle, M.D., Ph.D., Micah T. McClain, Ph.D.,  
Mark V. Rubertone, M.D., R. Hal Scofield, M.D., Gregory J. Dennis, M.D.,  
Judith A. James, M.D., Ph.D., and John B. Harley, M.D., Ph.D.

N ENGL J MED 349;16 WWW.NEJM.ORG OCTOBER 16, 2003

PRONÓSTICO

- **88%** (115/130) al menos un AAC (+) hasta **9,4 años antes** (X:3,3)
- **3,8%** del grupo control



# ANA (+) en paciente asintomático

## PRONÓSTICO

- En pacientes mayores con títulos bajos seguramente no tienen ningún valor
- En pacientes **jóvenes** es recomendable hacer un **seguimiento**
  - Sm específico de LES
  - Anti-La S Sjögren
  - Anti-Ro s Sjögren
  - Anticentrómero ES
  - Anti-Scl70 ES
  - Anti-U1RNP EMTC



Unidad de Enfermedades  
Autoinmunes Sistémicas  
HOSPITAL SAN CECILIO.  
GRANADA

José-Luis Callejas Rubio  
Raquel Ríos Fernández  
Daniel Sánchez Cano  
Norberto Ortego Centeno