

# Uso del sustrato Hep2000 en la detección de anticuerpos antinucleares. Estudio preliminar

M. J. Svetaz<sup>2</sup>; M. C. Alvarez<sup>2</sup>; J. L. Musuruana<sup>1</sup>; N. Abraham<sup>2</sup>; H. F. Pelusa<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Hospital Iturraspe, Santa Fe

<sup>2</sup> Dpto Bioquímica Clínica. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531 (S2002LRK) Rosario. Argentina

## Resumen

Los anticuerpos anti-Ro son hallados frecuentemente en pacientes con síndrome de Sjögren y lupus eritematoso sistémico y se asocian al fenómeno de fotosensibilidad, al eritema en la piel conocido como lupus cutáneo subagudo, vasculitis cutánea, enfermedad pulmonar intersticial y lupus neonatal.

Para su detección se usa como screening la técnica de inmunofluorescencia indirecta sobre sustrato Hep-2 y se confirma usualmente por técnicas de contrainmunoelectroforesis, doble difusión bidimensional, enzimoimmunoanálisis e inmunoblotting.

La reciente aparición del sustrato Hep2000, caracterizado por la sobreexpresión del antígeno Ro de 60 KDa, permitiría su identificación por inmunofluorescencia indirecta mediante la observación de un patrón distintivo.

En nuestro estudio observamos que la sensibilidad y especificidad en la detección de anticuerpos antinucleares por IFI en sustrato Hep-2 y Hep2000 es similar. El análisis de la presencia de a-Ro sérico en pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas a través de su detección por IFI en Hep2000 (patrón distintivo), comparado con doble difusión bidimensional y enzimoimmunoanálisis, nos permite concluir que el sustrato Hep2000 sería útil para sugerir la presencia de anti-Ro pero no para confirmarla.

**Palabras clave:** anticuerpos, antígeno Ro, lupus, Sjögren, inmunofluorescencia indirecta.

## Summary

Anti-Ro antibodies are frequently found in patients with Sjögren syndrome and systemic erythematosus lupus and they are associated to photosensitivity, skin erythema known as subacute cutaneous lupus, cutaneous vasculitis, interstitial pulmonary disease and neonatal lupus.

An indirect immunofluorescence (IIF) technique onto Hep-2 substrate is used as a screening for the detection of anti-Ro antibodies and counterimmunofluorescence techniques, bidimensional double diffusion, enzymeimmunoanalysis and immunoblotting are usually used to confirm its presence.

The recent development of the Hep2000 substrate, characterized by the overexpression of the 60 kDa Ro antigen, would allow its identification by indirect immunofluorescence through the observation of a distinctive pattern.

In our study, we observed that the sensitivity and specificity in the detection of antinuclear antibodies by IIF onto Hep-2 and Hep2000 substrates are similar. From the analysis of the presence of serum anti-Ro in patients with systemic rheumatic diseases through its detection by IIF onto Hep2000 (distinctive pattern), compared to bidimensional double diffusion and enzymeimmunoanalysis, we conclude that the Hep2000 substrate would be useful to screen for the presence of anti-Ro but not to confirm it.

**Key words:** antibodies, Ro antigen, lupus, Sjögren, indirect immunofluorescence.

## Correspondencia

E-mail: fpelusa@fbioyf.unr.edu.ar

## Introducción

Los anticuerpos (Ac) anti Ro (a-Ro) constituyen un subgrupo de anticuerpos antinucleares (ANA) de gran importancia clínica en ciertas enfermedades reumáticas sistémicas. Son hallados principalmente en el síndrome de Sjögren (SS) (alrededor del 60%), en el lupus eritematoso sistémico (LES) (alrededor del 30%) y en la mayoría de los pacientes con lupus cutáneo subagudo (LCS) y lupus neonatal (LN) aunque también pueden ser hallados en un 5 - 8% de pacientes con artritis reumatoidea<sup>1,2</sup>.

De todos los ANA, los a-Ro son los más específicos, siendo aún controvertida la elección de una técnica particular que reúna condiciones ideales de especificidad y sensibilidad para su detección.

En muchos laboratorios clínicos, el test de screening para la detección de ANA generalmente es la inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre sustrato Hep-2 o sustrato tisular animal (principalmente hígado de rata), siendo de elección el primero por su alta sensibilidad<sup>3</sup>.

La técnica de ANA por IFI en sustrato Hep-2 sugiere imágenes compatibles con la presencia de los a-Ro, no obstante su detección se realiza habitualmente por técnicas de contraelectroforesis (CIEF), doble difusión bidimensional (DD), enzimoimmunoanálisis (EIA) e inmunoblotting (IB), en forma aislada ó a través de la combinación de las mismas.

Enfermedades	Nº de pacientes
LES	13
Lupus cutáneo subagudo	1
SS primario	19
SS secundario	4
Esclerodermia	1
Artritis reumatoidea	5
Síndrome de superposición	6
LES + Penfigoide	2
Lupus eritematoso discoideo	3
Enfermedad de Behçet	1
Síndrome de Raynaud	1

**Tabla 1.** Distribución de las enfermedades en la población en estudio.

Recientemente la aparición del sustrato Hep2000, que sobreexpresa el antígeno (Ag) Ro de 60 kDa, ha sido introducido en los laboratorios clínicos por su asociación entre la presencia del a-Ro y un patrón distintivo (PD: 10-15% de las células en interfase presentan tinción nuclear con puntos brillantes y tinción nucleolar, el resto de las células son negativas y las metafases muestran un nucleoplasma positivo débil) que permitiría su identificación<sup>4,5</sup>.

## Objetivos

Nos propusimos: a) estimar sensibilidad y especificidad en la detección de ANA por IFI en los sustratos Hep-2 y Hep2000, b) analizar la presencia de a-Ro sérico en una población de pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas por Hep2000 y compararla con los resultados obtenidos por DD y EIA.

## Material y métodos

El estudio se realizó en nuestro laboratorio sobre 56 pacientes con enfermedades reumáticas sistémicas (Tabla 1), no seleccionados y consecutivos. La edad media de estos pacientes fue de 45 años, rango (16 - 84); 54 de sexo femenino y 2 pacientes de sexo masculino. Como grupo control se utilizaron muestras de suero provenientes de 10 donantes femeninos sanos. El diagnóstico clínico de los pacientes con SS fue realizado según el criterio de clasificación de la enfermedad propuesto por el Grupo de Estudio Multicéntrico Europeo<sup>6</sup>, el de los pacientes con LES según el criterio de clasificación para LES revisado en 1997 del American College of Rheumatism (ACR)<sup>7</sup>. El resto de las patologías reumáticas fueron diagnosticadas de acuerdo con criterios avalados por Sociedades Científicas Internacionales. La detección de a-Ro se realizó por EIA (Trinity Biotech S.A.), DD (Ags y controles INOVA Diagnostics) y Hep2000 (Immunoconcepts). La presencia de ANA se determinó por IFI con sustrato Hep-2 (Biorad), utilizando una dilución del suero 1/40. La misma dilución se aplicó al sustrato Hep2000. Los resultados de la detección de a-Ro obtenidos por las técnicas de Hep2000, EIA y DD fueron comparados en base al test de la Q de Cochran con la posterior aplicación del test de Mc Nemar.

## Resultados

En base a los objetivos planteados:

a) La comparación de la sensibilidad (basado en el estudio

sobre 56 pacientes) en la detección de ANA por IFI en sustrato Hep-2 y Hep2000 se efectuó mediante el test de Mc Nemar, y se concluyó que no existen diferencias significativas entre ambos sustratos. El intervalo de confianza del 95% resultó igual a  $0,69 \pm 0,12$  para el sustrato Hep-2 y  $0,73 \pm 0,12$  para Hep2000 (Tabla 2).

En cada uno de los diez controles se obtuvo concordancia en el resultado obtenido con ambos sustratos. En forma preliminar se concluye que la especificidad es del 80% para Hep-2 y Hep2000 (Tabla 3).

b) Los 41 pacientes enfermos cuyo resultado fue positivo con Hep2000 fueron clasificados según tres criterios: 1)

Tipo de patrón con Hep2000, no distintivo (Figura 2) o distintivo (Figura 3); 2) Resultado de a-Ro por EIA (positivo o negativo) y 3) Resultado de a-Ro por DD (positivo o negativo). Los resultados obtenidos al efectuar la clasificación se muestran en la Tabla 4. La Figura 1 muestra el control negativo en sustrato Hep2000.

La probabilidad de detección de a-Ro por Hep2000 (PD), EIA y DD no es la misma ( $p < 0,001$ ). La estimación para cada una de esas probabilidades es:

- p (Hep2000 patrón distintivo): 0,29
- p (resultado positivo por EIA): 0,85
- p (resultado positivo con DD): 0,05

	Hep-2 (+)	Hep-2 (-)	Total
Hep2000 (+)	38	3	41
Hep2000 (-)	1	14	15
<b>Total</b>	<b>39</b>	<b>17</b>	<b>56</b>

**Tabla 2.** Detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta (grupo de pacientes).

	Hep-2 (+)	Hep-2 (-)	Total
Hep2000 (+)	2	0	2
Hep2000 (-)	0	8	8
<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>8</b>	<b>10</b>

**Tabla 3.** Detección de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta (grupo control).

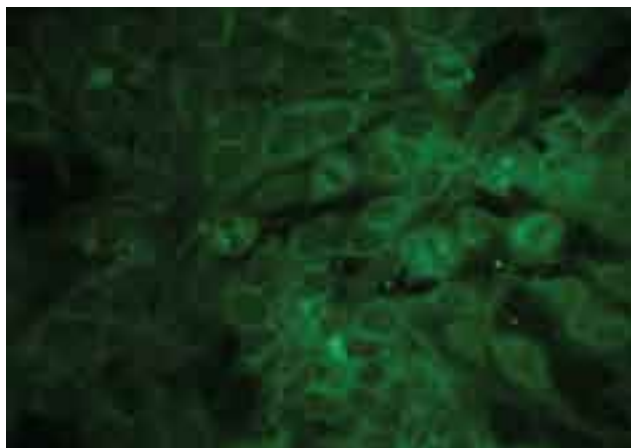
## Discusión

Los fabricantes de improntas de células Hep-2 no siguen estándares internacionales con normas preestablecidas para el cultivo, fijación y secado de las células, lo que trae como consecuencia que el antígeno Ro no esté preservado de la misma manera en los distintos sustratos Hep-2. Respecto a la capacidad de detección de ANA, el sustrato Hep2000 no mostró diferencias de sensibilidad y especificidad frente al sustrato Hep2 que usualmente utilizamos en nuestro laboratorio.

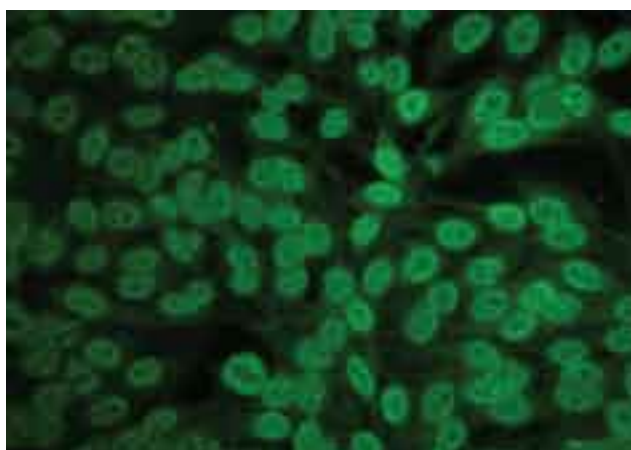
Hemos observado en nuestra población, contrariamente a lo esperado, una relativa ausencia del PD en Hep2000, y esto puede deberse a: 1) la presencia de otro patrón con alta intensidad que lo enmascare, lo que podría dilucidarse efectuando diluciones crecientes de los sueros, herramienta poco práctica y antieconómica que tampoco garantizaría la detección del mismo; 2) que las células transfectadas no expusieran todos los epítopes contra los que reaccionan los Ac a-Ro; 3) que la población estudiada haya sido determinante en el hallazgo del patrón distintivo, ya que aún cuan-

	Patrón distintivo		Patrón no distintivo		Total
	EIA (+)	EIA (-)	EIA (+)	EIA (-)	
DD (+)	0	0	2	0	2
DD (-)	12	12	21	6	39
<b>Total</b>	<b>12</b>	<b>0</b>	<b>23</b>	<b>6</b>	<b>41</b>

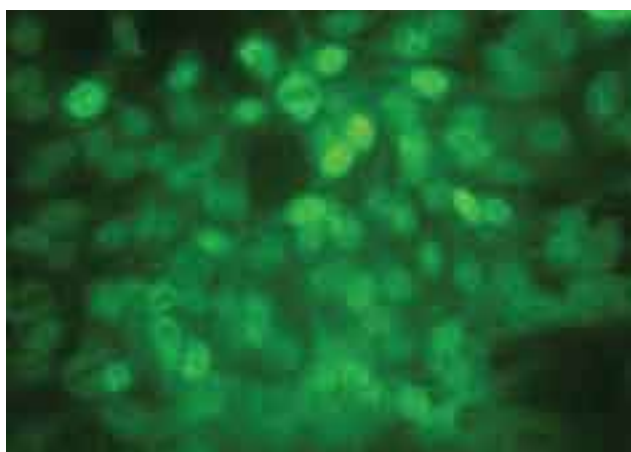
**Tabla 4.** Detección de anti-Ro por EIA y DD y su correlación con el patrón de tinción distintivo y no distintivo de Hep2000 por IFI.



**Figura 1.** Control negativo en sustrato Hep2000 (200 aumentos).



**Figura 2.** Patrón no distintivo Hep2000 (200 aumentos).



**Figura 3.** Patrón distintivo Hep2000 (200 aumentos).

do el a-Ro en pacientes con SS o LES pudiera reaccionar con la misma partícula de 60 kDa, lo hace contra diferentes epítopes<sup>8</sup>. A esto se le puede agregar que si bien el a-Ro de 60 kDa se presenta más frecuentemente en el LES, en el SS primario el a-Ro de 52 kDa es el de mayor frecuencia de presentación<sup>9,10</sup> (grupo mayoritariamente representado en la población estudiada). Otros grupos han reportado que en el LCS, LN y/o bloqueo cardíaco congénito, el Ac de mayor importancia, al igual que en el SS, estaría dirigido contra un epítipo ubicado entre los AA 200-239 de la partícula Ro52<sup>11</sup>. Existe una mayor prevalencia de a-Ro52 en aquellas madres a-Ro+, que dan a luz niños con bloqueo cardíaco congénito, así como en los sueros de los niños que padecen esta complicación, lo que evidencia que en estas situaciones de gran importancia clínica el sustrato Hep2000 podría no tener utilidad en la detección de dicho Ac. Probablemente, el método de EIA sería de mayor utilidad en estas situaciones ya que el antígeno de sensibilización de las placas está constituido por una mezcla de ambas partículas Ro (52 y 60 kDa).

Hasta el momento no existe ni en el criterio Europeo para la clasificación del SS, ni en el criterio de la ACR de clasificación para el LES (revisado en 1997), así como para los utilizados para otras enfermedades reumáticas sistémicas, una técnica estándar definida para la detección de ANA. Esto trae aparejado un cierto grado de confusión a la hora de analizar trabajos científicos donde estén involucrados los ANA, debido a que como muestra nuestro estudio la probabilidad de detección para algunos autoanticuerpos varía de acuerdo al método utilizado.

## Conclusiones

En la población estudiada no hallamos diferencias de sensibilidad y especificidad para la detección de ANA por IFI entre el sustrato Hep-2 utilizado frecuentemente en nuestro laboratorio y el Hep2000. Respecto a la detección de a-Ro en los pacientes analizados se desprende que el sustrato Hep2000 sería una herramienta útil para sugerir pero no para confirmar la presencia del mismo. Consideramos conveniente como metodología de trabajo, el uso de técnicas de diferente sensibilidad y especificidad para la determinación de la especificidad a-Ro.

## Agradecimientos

Agradecemos el análisis estadístico de los datos, realizado por la Est. Mercedes Leiva y la Bioquímica Hebe Bottai, de

la Cátedra de Estadística de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la U.N.R.

## Bibliografía

1. Chan EKL, Andrade LEC. Nuclear antibodies in Sjögren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 1992; 18:551-70.
2. Autoantibodies in systemic autoimmune diseases. A diagnostic reference. In: Conrad K, Schlossler W, Hiepe F, Fritzler M, eds. *Autoantigens, autoantibodies, autoimmunity*, Vol. 2. Lengerich: PABST Science Publishers, 2002:166-70.
3. Dore N, Synkowski D, Provost TT. Nuclear antibody determinations in Ro-SSA-positive nuclear-negative lupus and Sjögren's syndrome patients. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8:611-5.
4. Pollock W, Toh BH. Routine immunofluorescence detection of Ro/SSA autoantibody using HEp-2 cells transfected with human 60 kDa Ro/SSA. *J Clin Pathol* 1999; 52:684-7.
5. Bossuyt X, Meurs L, Mewis A, Mariën G, Blanckaert N. Screening for autoantibodies to SSA/Ro by indirect immunofluorescence using HEp-2000 cells. *Ann Clin Biochem* 2000; 37:216-9.
6. Vitali C, Bombardieri S, Moutsopoulos HM, Coll J, Gerli R, Hatron PY, et al. Assessment of the European classification criteria for Sjögren's syndrome in a series of clinically defined cases: results of a prospective multicentre study. The European Study Group on Diagnostic Criteria for Sjögren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 1996; 5:116-21.
7. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
8. Barakat S, Meyer O, Torterotot F, Youinou P, Briand JP, Kahn MF et al. IgG antibodies from patients with primary Sjögren's syndrome and systemic lupus erythematosus recognize different epitopes in 60 kD A/Ro protein. *Clin Exp Immunol* 1992; 89:38-41.
9. St Clair EW, Burch J, Saitta M. Specificity of autoantibodies for recombinant 60 kDa and 52 kDa Ro autoantigens. *Arthritis Rheum* 1994; 37:1373.
10. Sánchez-Guerrero J, Lew RA, Fossel AH, Schur PH. Utility of an anti RNP, anti Ro/SSA, anti La/SSB (extractable nuclear antigens) detected by enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1996; 39:1355.
11. Salomonsson S, Dörner T, Theander E, Bremme K, Larsson P, Wahren-Herlenius MA. Serologic marker for fetal risk of congenital heart block. *Arthritis Rheum* 2002; 46:1233-41.