



Trabajo Fin de Grado

Valoración de la técnica de quimioluminiscencia en el diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico.

Evaluation of chemiluminescence technique in the diagnosis of
Systemic Lupus Erythematosus.

Autor/es

M^a Ángeles Abellán González

Director/es

Dr. Luis Larrad Mur
Profesor Titular de Inmunología

Facultad de Medicina de Zaragoza
Junio 2017



Agradecimientos:

Hospital Clínico Lozano Blesa.

Abreviaturas:

Ac: Anticuerpos.

Ag: Antígeno.

ANA: Anticuerpos Antinucleares.

ANCA: Anticuerpos anti citoplasma de neutrófilos.

ds-DNA: DNA doble hélice o bicatenario

EA: Enfermedades Autoinmunes.

EIT: Electroinmunotransferencia.

EM: Ensayo Múltiple.

EMTC: Enfermedad Mixta del Tejido Conjuntivo.

Fc: Fracción constante.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína conjugado.

FR: Factor Reumatoide.

HCULB: Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

IFI: Inmunofluorescencia Indirecta.

Ig: Inmunoglobulinas.

LES: Lupus Eritematoso Sistémico.

PAGE-SDS: poli(acrilamida)dodecil sulfato de sodio.

PBS: Buffer fosfato salino

PE: Estreptavidina-ficoeritrina.

QL: Quimioluminiscencia.

REM: Radiaciones electromagnéticas.

RIA: Radioinmunoensayo

ss-DNA: DNA de hélice única o monocatenario.

Tº: Temperatura.

UV: Ultravioleta.

UZ: Universidad de Zaragoza.

ÍNDICE:

1. Resumen y palabras claves.....	4
2. Introducción.....	6
2.1. Enfermedades autoinmunes.....	6
2.1.1. Lupus Eritematoso Sistémico.....	6
2.1.1.1. Diagnóstico de laboratorio de LES.....	8
2.2. Técnicas de laboratorio para la detección de Enfermedades Autoinmune.....	14
2.2.1. Técnicas de luminiscencia.....	14
a. Inmunofluorescencia indirecta.....	14
b. Quimioluminiscencia.....	15
2.2.2. Técnicas inmunoanalíticas.....	15
a. Ensayo inmunoenzimático.....	15
b. Ensayo múltiple.....	16
c. Electroinmunotransferencia.....	16
3. Objetivos.....	17
4. Material y Métodos.....	17
4.1. Revisión Bibliográfica.....	17
4.2. Análisis de la cohorte.....	18
4.2.1. Selección de las muestras.....	18
4.2.2. Origen de la muestra.....	18
4.2.3. Datos epidemiológicos: distribución por sexo y edad.....	19
4.3. Métodos.....	19
4.3.1. Inmunofluorescencia Indirecta.....	19
a. Estudio de anticuerpos anti-nucleares.....	20
b. Estudio de anticuerpos anti- dsDNA.....	21
4.3.2. Técnica de Quimioluminiscencia.....	21
5. Resultados.....	23
5.1. Análisis de la Cohorte.....	23
6. Discusión.....	36
7. Conclusiones.....	36
8. Bibliografía.....	37
9. Anexos.....	39

1. Resumen y palabras claves.

Introducción: El Lupus Eritematoso Sistémico es el prototipo de enfermedad autoinmune sistémica del tejido conjuntivo. Es una enfermedad crónica inflamatoria de etiología desconocida, que se caracteriza por la producción de autoanticuerpos. Aunque el diagnóstico es clínico, sigue siendo un reto debido a la heterogenicidad de la enfermedad, por lo que el diagnóstico de laboratorio juega un papel importante. Existen múltiples técnicas para la detección de estos anticuerpos.

Objetivo: Valorar la posibilidad de la técnica de Quimioluminiscencia como técnica “gold standard” para la detección de anticuerpos anti-dsDNA en el Lupus comparándolo con la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta, método tradicional.

Material y métodos: Revisión bibliográfica realizada en la base de datos PUBMED y Biblioteca de la Facultad de Medicina (UZ) seleccionado según la disponibilidad de versión completa, publicados entre 2010-2017 y relevancia para el estudio. Además, análisis de una cohorte de 50 muestras provenientes del área del Hospital Clínico Lozano Blesa, cuyo criterio de selección fue considerar sólo aquellas muestras con anti-ANA positivo, para el estudio de anti-dsDNA con las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta y Quimioluminiscencia, y su posterior comparación.

Resultados y discusión: Las muestras con resultados positivos para ambas técnicas se podrían dar por buenos independientemente de los valores obtenidos por una u otra técnica. En el grupo de resultados discrepantes, sueros positivos por Inmunofluorescencia Indirecta y negativos por Quimioluminiscencia podrían ser aceptados, mientras que al contrario, sueros negativos por Inmunofluorescencia Indirecta y positivo por Quimioluminiscencia serían cuestionables. Los sueros negativos por ambas técnicas son los mejores resultados desde el punto de vista de una buena correlación, pues si ambas técnicas son negativas se puede decir que no se detectan anticuerpos contra dsDNA.

Conclusión: La Quimioluminiscencia no puede sustituir a la Inmunofluorescencia Indirecta para la investigación de anti-dsDNA en el diagnóstico de LES, aunque su empleo resulta útil para discriminar resultados negativos.

Palabras claves: “Enfermedad autoinmune”, “anticuerpos”, “anti-dsDNA”, “anti-ANA”, “Quimioluminiscencia”, “Inmunofluorescencia”, “Crithidia”, “Lupus”.

Abstract.

Introduction: Systemic Lupus Erythematosus is the prototype of systemic autoimmune disease of connective tissue. It is a chronic inflammatory disease of unknown etiology, which is characterized by the production of autoantibodies. Although the diagnosis is clinical, it remains a challenge due to the heterogeneity of the disease, so laboratory diagnosis plays an important role. There are multiple techniques for the detection of these antibodies.

Objective: To evaluate the possibility of Chemiluminescence as a gold standard technique for the detection of antibodies anti-dsDNA in Lupus, comparing it with the Indirect Immunofluorescence technique, which is the traditional method.

Materials and Methods: Bibliographic review of the PUBMED database and Library of the Faculty of Medicine (UZ) selected according to the availability of full version, published between 2010-2017 and relevance for the study. In addition, analysis of a cohort of 50 samples from the area of the Hospital Clínico Lozano Blesa, whose selection criterion was to consider only the samples with anti-ANA positive for the study of anti-dsDNA with the Indirect Immunofluorescence and Chemiluminescence technique, and their subsequent comparison.

Results and Discussion: Samples with positive results for both techniques could be considered good independently of the values obtained by either technique. In the group of discrepant results, positive samples by Indirect Immunofluorescence and negative by Chemiluminescence could be accepted, whereas on the contrary, negative samples by Indirect Immunofluorescence and positive by Chemiluminescence would be questionable. The negative samples by both techniques are the best results from the point of view of a good correlation, because if both techniques are negative it means that antibodies against dsDNA are not detected.

Conclusion: Chemiluminescence can not replace Indirect Immunofluorescence for the investigation of antibodies against dsDNA, although its use is useful to discriminate negative results.

Keyword: “Autoimmune diseases”, “autoantibodies”, “anti-dsDNA”, “Anti-ANA” “chemiluminescence”, “immunofluorescence”, “Crithidia” y “Lupus”.

2. Introducción.

2.1. Enfermedades autoinmunes.

La autoinmunidad es una condición de respuesta inmunológica anómala frente a uno o varios antígenos propios, que se caracteriza por una pérdida de tolerancia inmune. Una respuesta autoinmune persistente genera un daño tisular que perdura en el tiempo y alteración de la homeostasis que da lugar a la enfermedad autoinmune. Mientras que la autoinmunidad es un fenómeno fisiológico, la enfermedad autoinmune es un síndrome clínico, que se caracteriza por la activación de células T y/o B, que conducen al daño tisular, y por lo tanto, patología [14].

Las causas son multifactoriales (inmunológicos, hormonales, ambientales y genéticas) y la predisposición genética es poligénica, estando relacionados sobre todo aquellos involucrados con el reconocimiento de proteínas de superficie de membrana celulares del sistema inmunológico y las que forman el resto del organismo. Existen ejemplos de asociación entre las EA y determinados antígenos del Sistema Principal de Histocompatibilidad, ya que estos genes pueden influir en la selección de los linfocitos autorreactivos y en el desarrollo de autotolerancia [13].

Las EA se clasifican en sistémicas y órgano-específicas. En las EA sistémicas los anticuerpos atacan a antígenos en más de un órgano o sistemas, en este grupo encontramos las enfermedades del tejido conjuntivo (LES, Esclerosis Sistémica, Síndrome de Sjörgen, Dermatomiositis-Polimiositis y las mixtas), Síndrome de Goodpasture, Vasculitis Sistémicas, Síndrome Antifosfolípidos y Artritis Reumatoide; mientras que en las EA órgano-específicas se afectan un órgano en particular, que con frecuencia suele ser endocrino [13, 14].

En los últimos 30 años se ha producido un aumento en la incidencia de enfermedades alérgicas y autoinmunes en los países desarrollados. El 5% de la población occidental padece un EA [14].

En cuanto a la edad de aparición, se sitúa en la segunda década de la vida y respecto al género son mucho más frecuentes en la población femenina, en una proporción de 8:1 [14].

Nos centraremos en la enfermedades autoinmunes sistémica, un grupo de patologías de gran importancia por sus manifestaciones clínicas y complicaciones durante su evolución, y que en ocasiones nos plantea dificultad para el diagnóstico y el tratamiento, y dentro de este grupo, en las enfermedades del tejido conjuntivo en las que se incluyen entidades más o menos diferenciadas que presentan con gran frecuencia signos y síntomas comunes, lo que hace cada vez más necesario la utilización de pruebas diagnósticas que las diferencien.

Una de las características de las enfermedades autoinmunes sistémicas del tejido conjuntivo es la producción de anticuerpos (Ac) dirigidos contra estructuras celulares propias. La mayoría son anticuerpos antinucleares (ANA), aunque otros son anti citoplasmáticos o reconocen estructuras en la superficie celular (Anexo: Ilustración 1 y Tabla 1).

2.1.1. Lupus Eritematoso Sistémico

El Lupus Eritematoso Sistémico es el prototipo de las enfermedades autoinmunes del tejido conjuntivo. Es una enfermedad crónica inflamatoria de etiología desconocida, caracterizada por la producción de autoanticuerpos y complejos inmunes que puede afectar a muchos órganos, incluyendo la piel, las articulaciones, el sistema nervioso central y los riñones [2].

La incidencia de la enfermedad es de 5-7 casos/100.000 habitantes/año, y su prevalencia es de 15-50/100.00 habitantes en Europa y Norte América, las variaciones dependen de la edad, género y grupo étnico. Ciertos grupos étnicos tienen mayor predisposición a desarrollar esta enfermedad: mujeres caucásicas de entre 15 a 64 años tienen una prevalencia de 1/700, mientras que en las mujeres afro-Americanas y Asiáticas la prevalencia es mayor (1/245) [2, 14].

Es una enfermedad que predomina en mujeres en edad fértil, segunda década de la vida. Su etiología es aún desconocida y multifactorial. Las interacciones genéticas con factores ambientales, en particular con la exposición a la luz UV solar, infecciones por el virus de Epstein-Barr, estrés y factores hormonales, pueden iniciar la enfermedad [2, 6].

Las manifestaciones clínicas son variables: afectación del estado general (fiebre, malestar, dolores articulares, mialgias y fatiga), así como de la piel (erupción malar en “alas de mariposa”), vasos sanguíneos, sistema nervioso, articulaciones y riñones. El compromiso de la piel y las articulaciones son las manifestaciones más frecuentes, pero la afectación renal y neurológica es lo que define el pronóstico de la enfermedad. Aunque el diagnóstico es fundamentalmente clínico, sigue siendo un reto debido a la heterogenicidad de la enfermedad, por lo que el diagnóstico de laboratorio juega un papel muy importante en la detección del LES [2, 4].

En la actualidad no existen criterios diagnósticos, sino criterios de clasificación. En 1982 el *American College of Rheumatology* estableció once criterios de clasificación para el LES, revisados en 1997 [1] y que son los siguientes:

- 1) Erupción malar.
- 2) Eritema discoide.
- 3) Fotosensibilidad.
- 4) Úlceras /aftas orales.
- 5) Artritis (poliartritis no deforme).
- 6) Serositis (pleuritis ó pericarditis).
- 7) Enfermedad renal (proteinuria >0'5 g/día o cilindros celulares).
- 8) Trastornos neurológicos (psicosis y/o crisis epilépticas).
- 9) Trastornos hematológicos (anemia hemolítica o leucopenia o linfocitopenia o trombocitopenia).
- 10) Anticuerpos: anti-DNA, Anti-Sm, falso positivo en estudio serológico para sífilis o anticuerpos antifosfolípidos positivos.
- 11) Anticuerpos anti-ANA.

Se deben cumplir cuatro de los once criterios a la misma vez o de forma sucesiva, durante el intervalo de observación.

Por otra parte, en el año 2012 el *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology* (SLICC) estableció otros criterios de clasificación en los que se reúnen un número mayor de manifestaciones clínicas, determinando un diagnóstico de forma más precoz con impacto en la morbimortalidad de los pacientes [1].

- 1) Lupus cutáneo agudo o lupus cutáneo subagudo.
Eritema malar (no discoide), lupus bullosos, necrosis epidérmica tóxica (variante del LES), eritema lúpico maculopapular, eritema lúpico fotosensible, todo ello en ausencia de Dermatomiositis; ó Lupus cutáneo agudo: lesiones psoriaformes no induradas y/o lesiones policíclicas anulares que se resuelven sin dejar cicatriz, aunque en ocasiones pueden dejar telangiectasias o despigmentación tras la inflamación.

- 2) Lupus cutáneo crónico.
Eritema discoide clásico por encima del cuello (localizado) o por encima y por debajo del cuello (generalizado), lupus cutáneo hipertrófico (verrugoso), paniculitis lúpica (lupus profundus), lupus mucoso, lupus eritematoso tumidis, solapamiento de lupus discoide/ liquen plano.
- 3) Alopecia no cicatricial.
Adelgazamiento difuso o fragilidad del cabello con pelos rotos visibles, en ausencia de otras causas como alopecia areata, fármacos, déficit de hierro y alopecia androgénica.
- 4) Úlceras (aftas) orales.
En cavidad oral o lengua o nasales, en ausencia de otras causas como vasculitis, enfermedad de Behcet, infección por herpes virus, enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reactiva y alimentos ácidos.
- 5) Afectación articular: sinovitis en 2 o más articulaciones y/o sensibilidad dolorosa en 2 o más articulaciones y al menos 30 minutos de rigidez matutina.
- 6) Serositis (Pleuritis y/o pericarditis).
- 7) Enfermedad renal (proteinuria >0'5 g/día o cilindros celulares).
- 8) Afectación neurológica (psicosis y/o crisis epilépticas).
- 9) Anemia hemolítica.
- 10) Leucopenia.
- 11) Plaquetopenia.

Trastornos inmunológicos [10]:

- 1) Anti-ANA
- 2) Anti-DNA
- 3) Anti- Sm
- 4) Anticuerpos antifosfolípidos: anticoagulante lúpico, prueba de reagina rápida positiva falsa, títulos medios o altos de Ac. Anticardiolipina (IgA, IgG ó IgM), presencia de anticuerpos anti-b2-glicoproteína I.
- 5) Niveles bajos de complemento C3, C4 ó CH50
- 6) Test de Coombs directo positivo en ausencia de anemia hemolítica.

Los criterios son acumulativos y no tienen que estar presentes al mismo tiempo. Para que un sujeto pueda ser clasificado como LES deben cumplirse de los 11 criterios clínicos y los seis inmunológicos por lo menos cuatro y, de estos, uno debe ser, por lo menos, clínico y otro inmunológico o, por otra parte, que el paciente presente nefritis lúpica con ANA positivo o anti-DNA positivo [1].

2.1.1.1. Diagnóstico de laboratorio de LES.

Ante la sospecha de una Enfermedad Autoinmune Sistémica es necesario realizar una analítica con un perfil inmunológico básico que incluya: ANA, Factor Reumatoide (FR) y valores de complemento (C₃, C₄ y CH₅₀). La determinación inicial de estos parámetros nos ayudará tanto en el cribado inicial como en la confirmación de la sospecha o presencia de este tipo de enfermedades. A continuación, basándonos en la clínica, exploración física y perfil analítico de rutina e inmunológico básico del paciente, se debe solicitar aquellos parámetros con mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica de la enfermedad autoinmune sistémica que sospechemos. En muchos laboratorios estos parámetros están protocolizados por perfiles para

cada sospecha diagnóstica, de modo que se van realizando de forma secuencial, según la validación y criterio del analista, permitiendo así una mayor eficacia diagnóstica y económica [14].

Si sospechamos un LES (Tabla 1):

Sospecha Diagnóstica	Perfil analítico:		
	1º Elección: Diagnóstico y Pronóstico	2º Elección: Diagnóstico, pronóstico y Seguimiento.	3º Elección: complementarios.
LES (15-40 años, mujer, clínica compatible)	<ul style="list-style-type: none"> • ANA • FR • C₃, C₄, CH₅₀ 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-dsDNA • Anti-histonas • Anti-ENA: Sm, Ro, La 	<ul style="list-style-type: none"> • Anti-ENA y Otros

Tabla 1. Perfil analítico de solicitud para el diagnóstico de LES

La primera prueba que se solicita en la evaluación de una enfermedad autoinmune son los anticuerpos anti-ANA. Es la prueba cribado más representativa para las enfermedades del tejido conectivo y tiene una sensibilidad del 90%. A pesar de que se detectan en un 95% de los casos de LES, también pueden estar presentes en otras situaciones e incluso en población sana, sobre todo en los casos de títulos <1/160, ya que la prevalencia de ANA en la población general aumenta con la edad, y un pequeño porcentaje de la población > 60 años puede presentar títulos bajos sin ninguna significación clínica, por lo que no está indicado su determinación en ausencia de signos y síntomas de EA. La IFI con sustrato de células Hep-2 es el método estándar y de primera elección para el estudio de estos, aunque también se puede utilizar otras técnicas de laboratorio como ELISA ó QL [14, 18].

En IFI para valorar los ANA hemos de considerar el título:

- <1/40: negativo
- 1/40 – 1/80: positivo bajo
- 1/160 – 1/320: positivo medio
- > 1/640: elevado

La presencia de ANA positivos medio-altos pueden orientarnos inicialmente a determinadas EA sistémicas teniendo en cuenta la edad y la clínica que presenta el paciente, siendo el patrón periférica el más sugerente de LES (sensibilidad 100% y especificidad 86%). Títulos < 1/80 indica una probabilidad menor de 3-5% de padecer Lupus, y un resultado negativo nos descartaría LES. Los falsos negativos son poco frecuentes y por lo tanto, no estaría justificado el uso de otras técnicas en sueros negativos, esto nos tendría que hacer sospechar otras enfermedades autoinmunes. [14]

En cuanto al FR, es positivo en adultos sanos en un 5% y en mayores de 75 años puede llegar a 25%. Aunque sólo es diagnóstico de artritis reumatoide (y no es imprescindible), no es exclusivo de esta enfermedad, ni siquiera de las enfermedades autoinmunes. [14]

Respecto al complemento, las alteraciones de C3, C4 y CH50 no son patognomónicas de las Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, pero deben de hacernos sospechar sobre todo si disminuyen, ya que el consumo del complemento se correlaciona con la presencia de actividad inmunológica. [14]

Por lo tanto, ante un paciente con manifestaciones clínica de LES, resultado ANA positivo, FR negativo y Complemento bajo, el siguiente paso sería estudiar el resto de anticuerpos que pueden estar presentes en el LES para confirmar el diagnóstico.

Los anticuerpos que podemos encontrar en este tipo de enfermedad son: Anti-DNA nativo, monocatenario y/o bicatenario, anti-histonas, anti-Sm, anti-U₁-RNP, anti-Ro/SSA, anti-La/SSB, antiproteínas ribosomales, antifosfolípidos y anti-PCNA [9].

- *Anticuerpo Anti-DNA:*

Comprende un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas con especificidades y avides diferentes. Pueden ser de tres clases:

- DNA bicatenario (ds-DNA), aunque es muy raro, es específico del LES
- DNA monocatenario (ss-DNA) son anticuerpos de baja avides y tiene escaso valor diagnóstico por su alta especificidad.
- DNA nativo, los más frecuentes en el LES.

Los Ac anti-DNA naturales son de IgM, polirreactivos y de baja avides. En cambio, los IgG son Ac patológicos, de reactividad restringida y gran avides, siendo la subclase IgG2 más patogénica que la IgG1. En el LES podemos encontrar ambos. La presencia de anti-DNA nativo en el LES es de un 70-80%, siendo los de IgG altamente específicos, mientras que los IgM pueden aparecer en otras conectivopatías. La detección de estos Ac se correlacionan con la actividad clínica en el LES. Se asocian sobre todo con nefropatía lúpica y concentraciones bajas de complemento, y en algunos casos con neuropatías, alteraciones hematológicas y cutáneas.

- *Anticuerpos Anti-histonas:*

Existen varios tipos según reconozcan el cuerpo histona o las fracciones aisladas. Su presencia en el LES varía entre un 50-70%. Se asocian sobre todo con el lupus inducido por fármacos (procainamida, hidralazina e isoniazida).

- *Anticuerpos anti-Sm:*

Se encuentran entre un 25-30% de pacientes con LES, son específicos. No se ha confirmado que su presencia se relacione con ninguna característica clínica ni con la actividad del LES, por lo que su cuantificación no resulta muy útil.

- *Anticuerpos Anti-U₁-RNP:*

Presentan reacciones cruzadas con los Ac Anti-Sm y es frecuente detectarlos juntos. Aparece entre un 25-30% de los casos de LES, y son característicos de EMTC. Los de clase IgM son más frecuentes en el LES y se asocian con la presencia de fenómeno de Raynaud y una baja incidencia de nefropatía.

- *Anticuerpos Anti-Ro/SSA:*

Son los anticuerpos más importantes a determinar después de los ANA. Todos los pacientes con Ac Anti-Ro/SSA presentan una clínica predominante cutánea. En el LES se asocian con el inicio más tardía de la enfermedad, por encima de los 50 años. Es marcador de afectación visceral poco grave, por la menor incidencia de nefropatía, sobre todo si existe presencia concomitante de Ac Anti-La. Si nos encontramos con Ac Anti-Ro y anti-DNA nativo, pero no hay Anti-La, la probabilidad de nefropatía grave aumenta considerablemente.

- **Anticuerpos Anti-La/SSB:**
Casi siempre se encuentran asociados a los Ac Anti-Ro. Se encuentran en un 10-15% de LES. Su presencia también confiere buen pronóstico, ya que se asocia a un inicio tardía de la enfermedad y una baja tasa de nefropatía y lesiones cutáneas, y una mayor frecuencia de artritis, factor reumatoide e hipergammaglobulinemia.
- **Anticuerpos Antiproteínas P ribosomales:**
Son muy específicas del LES, pero sólo aparecen en un 10-30% de los casos. Se detectan en pacientes con psicosis lúpica y otros autores los correlacionan con LES activo, además se han correlacionado con fotosensibilidad
- **Anticuerpos Antifosfolípidos:**
Existen tres tipos: el anticoagulante lúpico, los Ac anticardiolipina y los Ac antifosfolípidos distintos de la cardiolipina. Son característicos del Sd. antifosfolípidos, pero también están presentes en un 25% de los casos de LES.

Autoanticuerpo	LES y prevalencia	Importancia Clínica
Histonas	LE por fármacos: 95% LES: 30-70%	Sólo un pequeño porcentaje de LE por fármaco desarrolla la enfermedad. En LES, se asocia con enfermedad activa.
dsDNA	LES: 60-90% LES activo: <ul style="list-style-type: none"> • Con afectación renal: >95% • Sin afectación renal: 50-70% LES inactivo: < 40%	Marcador específico en LES, correlacionado con la actividad de la enfermedad y marcador de lesión tisular. Está asociado con un aumento del riesgo de padecer nefritis.
U1-RNP	LES: 30-40%	Indican buen pronóstico sobre el desarrollo de la afectación renal.
Sm	LES: 10-30%	Muy específico para LES
Rib-P	LES: 20%	Específico de LES. Se relaciona con enfermedad activa.
SS-A/Ro	LES: 40-50%	Riesgo elevado de padecer lupus neonatal si la madre tiene Anti-SSA/Ro y Anti-SSB/La
SS-B/La	LES: 5-15%	Se encuentran casi siempre combinados con Anti-SSA/Ro

Tabla 2. Prevalencia e importancia clínica de los diferentes autoanticuerpos en el LES [14].

De todos estos anticuerpos, el más utilizado para confirmar el diagnóstico de LES son los Anti-dsDNA, ya que se encuentran en el 60-70% de los pacientes con LES y en un 90% de LES activa, con un 95% de especificidad, y por esta razón, forman parte de los criterios de clasificación para el LES tanto del *American College of Rheumatology* como del *Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology (SLICC)*. Además de su valor para el

diagnóstico, los anti-dsDNA tienen un papel importante en el control de la enfermedad. El aumento de los niveles de anti-dsDNA se ha asociado con reagudizaciones de la enfermedad, usualmente en combinación con la disminución de los niveles de complemento C3 y C4. Aunque la actividad de la enfermedad no siempre se correlaciona con estas alteraciones, como describen algunos autores. Sin embargo, otros autores defienden el valor predictivo de los Anti-dsDNA en el LES, especialmente en relación con la nefritis lúpica, pues se ha visto que las exacerbaciones de la enfermedad están precedidas por un incremento constante y paulatino de los anti-dsDNA, seguido de una disminución súbita en el momento en que se manifiesta la reagudización. Como la enfermedad renal es la mayor causa de morbi-mortalidad en el LES, la evidencia de relación entre los anticuerpos anti-dsDNA y el daño tisular renal permiten utilizar estos anticuerpos con mucha frecuencia tanto para el diagnóstico como para el seguimiento del LES [5,12].

El resto de anticuerpos son útiles en el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de la enfermedad pero su prevalencia es menor, por lo que podemos encontrar pacientes con LES y anti-Sm, anti-histonas, anti-Rib-P, anti-U1-RNP, anti-Ro y/o anti-La negativos, por lo que su estudio debe individualizarse según el paciente.

A pesar de que varios sistemas de ensayos han sido desarrollados en la última década para la detección de los anticuerpos anti-dsDNA, persiste la controversia sobre cuál es el mejor test para medir estos anticuerpos. Aunque el RIA (prueba de Farr) era considerado la prueba "gold standard" para la detección de anti-dsDNA ya que detecta anticuerpos de alta avidéz, en algunos laboratorios, actualmente está cayendo en desuso debido a la utilización de material radiactivo, dejando paso a otras técnicas como ELISA, que detecta los de alta y baja avidéz, por lo que es muy sensible, y a otras más específicas como la IFI con hemoflagelados de *Crithidia luciliae*, que permite identificar los anticuerpos por su unión al DNA nativo del quinetooplasto que normalmente se ubica entre el núcleo y la base del flagelo (sensibilidad 62% y especificidad 99% en LES), esta última es la técnica más implantada en los laboratorios actualmente para la determinación de los anti-dsDNA [8, 9].

En cuanto a la interpretación, es importante distinguir el quinetooplasto, que se encuentra próximo al flagelo y es más pequeño que el núcleo. Los resultados se expresan como positivos si se observa una fluorescencia verde en el quinetooplasto del parásito, a una dilución 1/10 y se consideran negativos aquellos sueros que no presentan fluorescencia en esa organela. Además, se recomienda titular los sueros positivos, ya que títulos mayores o iguales a 1/160 sugieren LES en actividad. Es importante no confundir la fluorescencia del quinetooplasto con la fluorescencia de la porción basal del flagelo, el cual no tiene ningún significado clínico [14].

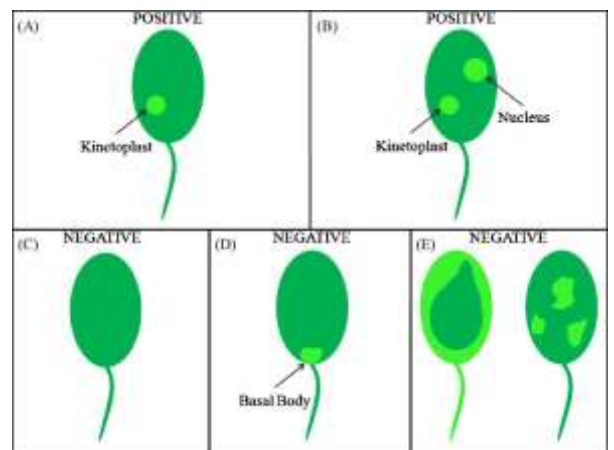


Ilustración 1. Interpretación de los resultados según lugar de fluorescencia. Verde claro y verde oscuro representan alto y bajo fluorescencia respectivamente [16].

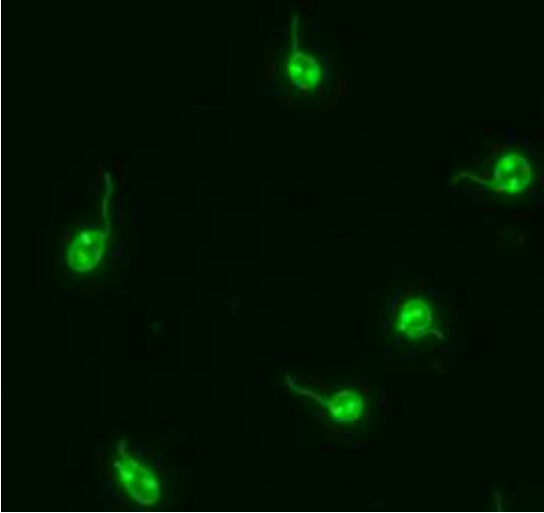


Ilustración 2. *Crithidia lucilliae* 40X

Los resultados son graduados de 0 a 4 de acuerdo con la intensidad: 4) fluorescencia altamente brillante verde manzana, 3) fluorescencia brillante verde manzana, 2) fluorescencia positiva claramente distinguible, 1) fluorescencia específica más baja que permite diferenciar claramente la tinción quinetoplástica de la fluorescencia de fondo, y 0) negativo [8].

El problema de esta técnica es que es cualitativa o semicuantitativa y la lectura e interpretación de los resultados requiere de gran experiencia por parte del observador, lo que dificulta la reproductibilidad entre observadores y entre laboratorios. Por este motivo, aunque la detección de anticuerpos por métodos con IFI y ELISA han estado disponibles durante años y todavía se siguen utilizando, la aparición de instrumentos completamente automatizados usando tecnología de quimioluminiscencia en los últimos años ha llevado a una rápida adopción de esta en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes. En 2011 se introdujo BIO-FLASH un analizador de quimioluminiscencia multiparamétrico, totalmente automatizado y aleatorio, que obtiene los resultados en 30 minutos a diferencia de la IFI que tarda alrededor de 60 minutos, además la detección es cuantitativa lo que corrige el problema de la falta de reproductibilidad de la IFI. Otras ventajas de la técnica de quimioluminiscencia es que ofrece mayor sensibilidad analítica (límite de detección y límite de cuantificación), mayor especificidad, mayor precisión, mayor linealidad y mayor versatilidad en la unión de proteínas. Además de BIO-FLASH, existen otros analizadores disponibles como Zenit RA o LIASON, pero el BIO-FLASH es el que tiene su uso más extendido en el campo de la autoinmunidad [3].

Mahler *M et al.* [3] realizaron una revisión sobre de la evolución de la técnica de QL para la detección de autoanticuerpos y su comparación con las técnicas convencionales en la detección de estos, con correlaciones en los resultados de moderado a excelentes dependiendo del estudio, a pesar de esto, están de acuerdo en que la QL ha mejorado el estudio de los autoanticuerpos tanto para el diagnóstico como para el seguimiento de las enfermedades autoinmunes y por lo tanto es un técnica a tener en cuenta.

Infantino M et al. [8] también realizaron un estudio de revisión en el que comparando Quanta flash dsDNA QL con otros métodos (IFI, ELISA Y BioPlex) para ellos seleccionaron 161 sueros, 61 pacientes con LES y 100 controles, y después una segunda cohorte de 69 pacientes testados sólo con Quanta-flash e IFI. En cuanto a las conclusiones, observaron variaciones significativas entre los distintos métodos de detección de dsDNA en la primera parte del estudio y en la segunda parte observaron que Quanta-flash proporcionaba una buena combinación de sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de LES, además de buena correlación con IFI, por lo que no consideran necesario el uso de métodos de confirmación posterior con IFI. Sin embargo, su

cohorte de pacientes es pequeña a pesar de haber observado variaciones significativas, por lo que son necesarios futuros estudios que confirmen sus observaciones.

González DA et al. [7] realizaron un revisión para determinar la estrategia más eficiente (RIA, ELISA, IFI y QL) en la detección de anti-dsDNA para el diagnóstico de LES. La conclusión de su estudio fue la siguiente: para el screening de LES, la detección de anti-dsDNA en aquellos pacientes que mostraron un patrón ANA homogéneo o moteado mostró un aumento de la especificidad y del valor predictivo positivo en comparación con otros patrones ANA. En cuanto a las técnicas la combinación RIA + QL demostró ser más sensible y más costo-eficiente que el resto de combinaciones o técnicas aisladas. Sin embargo, se detectaron casos con anti-dsDNA positivo y anti-ANA negativo, estos resultados pueden ser atribuibles a un error de laboratorio o a la contaminación de ds-DNA con ss-DNA, que reduce su especificidad. Otras limitaciones de este estudio fueron el seguimiento de los pacientes sólo durante 3 años, pues los anticuerpos pueden aparecer años antes que la clínica y, que sus conclusiones no son válidas para los pacientes con resultados anti-dsDNA negativos.

2.2. Técnicas de laboratorio para la detección de Enfermedades Autoinmune.

Las técnicas inmunológicas son de gran ayuda en las Enfermedades Autoinmunes, ya que permiten la detección de varios autoanticuerpos simultáneamente a partir de volúmenes de muestra pequeños. Gracias al desarrollo de nuevas técnicas, la sensibilidad y especificidad en la detección de los diferentes anticuerpos también han ido en aumento, de tal manera que el profesional médico puede contar con pruebas que le permiten hacer los diagnósticos tempranos con mayor certeza y hacer también el seguimiento del curso de la enfermedad en función de la variación de los anticuerpos presentes en las muestras de los pacientes.

Podríamos dividir las técnicas inmunológicas en técnicas de luminiscencia, que sobresalen por su extraordinaria especificidad, y en técnicas inmunoanalíticas que conllevan una gran sensibilidad. El empleo de esta última utilizando detección luminiscente o quimioluminiscente satisface los requerimientos de selectividad y sensibilidad que deben poseer los métodos analíticos que se empleen en el análisis de biomarcadores.

Entre las técnicas más utilizadas se encuentran:

2.2.1. Técnicas de luminiscencia.

La determinación de anticuerpos antinucleares es una prueba de gran utilidad en el diagnóstico de diversas enfermedades del tejido conectivo. El método estándar para su determinación es la inmunofluorescencia indirecta, cuyas desventajas, como subjetividad y complejidad, han propiciado la generación de nuevos ensayos; uno de ellos es la quimioluminiscencia, siendo ésta una técnica automatizada de alta sensibilidad.

a. Inmunofluorescencia indirecta.

Es una técnica de alta especificidad pero poco sensible, que consiste en el reconocimiento de los anticuerpos que reconocen estructuras antigénicas celulares nativas. La interacción se evidencia por medio de un anticuerpo antiinmunoglobulina humana, dirigido contra las fracciones constantes (Fc) de las inmunoglobulinas IgG, IgA y/o IgM. Este anticuerpo antiinmunoglobulina humano está conjugado o acoplado a un fluoróforo. Se evalúan en un microscopio de epifluorescencia.

La detección de anticuerpos anti-DNA se hace utilizando como sustrato *Crithidia liciliae*, para la detección de ANA se utilizan como sustratos líneas celulares epiteliales humanas como las células HEp-2, para la detección de ANCA, se utilizan neutrófilos fijados en etanol y formalina, y para los anticuerpos que reconocen antígenos órgano-específicos se utilizan como sustratos cortes de tejidos específicos. (Anexo:Tabla 2)

El problema de esta técnica es que la lectura e interpretación requieren de amplia experiencia, por lo que pueden llevar a la falta de reproductibilidad, lo cual ya ha sido documentado, encontrándose coeficientes de variación interlaboratorios entre 36 y 51% [13, 17].

b. Quimioluminiscencia.

Aunque el fenómeno de la Quimioluminiscencia se conoce desde 300 años a.C., el desarrollo de aplicaciones analíticas es relativamente reciente. Debido a su alta sensibilidad y selectividad, los métodos basados en detecciones quimioluminiscente suponen una herramienta analítica de gran utilidad. Consiste en un proceso de emisión de radiación electromagnética por parte de un compuesto en estado excitado. Este estado excitado se habrá alcanzado como consecuencia de una reacción química. La medida de la radiación emitida por la muestra problema, es directamente proporcional a la concentración de analito. Se realiza con un luminómetro, mucho más accesible que un fluorímetro.

La Metodología es sencilla, rápida y con gran intervalo de respuesta lineal. Sin embargo, las enzimas empleadas como marcadores que catalizan reacciones quimioluminiscentes pueden inactivarse durante las reacciones de marcaje. Sólo podrán marcar antígenos de bajo peso molecular.

2.2.2. Técnicas inmunoanalíticas.

Poseen gran sensibilidad, ya que son capaces de detectar biomarcadores en muy bajas concentraciones, y selectividad, pues evitan resultados erróneos (falsos positivos y falsos negativos). Se basan en reacciones antígeno-anticuerpo y/o enzima-sustrato. Se pueden evaluar mediante absorción ó emisión de radiaciones electromagnéticas (REM), o midiendo las radiaciones ionizantes emitidas por isótopos radiactivos.

a. Ensayo inmunoenzimático.

La más utilizada para identificar o confirmar la especificidad de los anticuerpos presentes en las muestras de los pacientes con enfermedades autoinmunes. Por su fácil estandarización, manejo y variedad de antígenos disponibles, ha desplazado a otras técnicas como el radioinmunoensayo (RIA) para la detección de anticuerpos anti-DNA, ya que no utiliza radionúclidos, lo que hace que sea una técnica accesible y de bajo riesgo. La más utilizada en el laboratorio es el ELISA indirecto Presenta tres elementos constantes (analito, conjugado y sustrato). En la mayoría de los casos se utiliza enzimas como marcadores inmunoquímicos: peroxidasa, fosfatasa alcalina, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa y beta-galactoxidasa.

Se fundamenta en el reconocimiento de los anticuerpos específicos presentes en las muestras de los pacientes mediante un anticuerpo dirigido contra la región Fc humana de cualquier isotipo (IgA, IgG ó IgM) e inclusive de cualquier subclase (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2). Los anticuerpos anti-Fc están unidos a las enzimas. Después de permitir la interacción, se realizan lavados para eliminar los anticuerpos inespecíficos y se agrega el anticuerpo antiinmunoglobulinahumana unido a la enzima, permitiendo la interacción por un tiempo determinado. Posteriormente, se adiciona la solución que contiene el sustrato-cromogénico

específico de la enzima el cuál cambiará de color en función de la cantidad de anticuerpos conjugados con la enzima y cuya cantidad depende de los anticuerpos del paciente que reconocieron al antígeno pegado a la placa. La intensidad de coloración es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo unido al antígeno. La técnica puede ser cualitativa o cuantitativa.

Es una técnica rápida, con buena sensibilidad y especificidad, y una muy buena respuesta cuantitativa. Sin embargo, no es posible cuantificar un elevado número de biomarcadores debido a la falta de enzimas específicas, por ejemplo, para antígenos citoplasmáticos o nucleares desconocidos [17].

b. Ensayo múltiple.

Permite la detección de hasta 100 diferentes autoanticuerpos que reconocen el mismo número de antígenos en una sola determinación y con un volumen pequeño de muestra (aproximadamente 50 ml). Es una variante del ELISA indirecto, pero la detección es distinta: ELISA utiliza compuestos cromogénicos, mientras que en el EM la detección se realiza por fluorescencia, con lo que la sensibilidad del ensayo es mayor.

La determinación de la cantidad de anticuerpo unido al antígeno se revela por la interacción de un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado con biotina. Posteriormente adiciona un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (PE). El ensayo se lee en un luminómetro. Cuando se hacen pasar por el detector de fluorescencia, las microesferas que contienen los complejos Ag-Ac, el colorante de las microesferas y la PE se excitan por haces de luz longitudinales de onda 635 y 488 nm respectivamente. La luz del láser que pasa por el filtro de longitud de onda 635 nm excita el fluorómetro de la microesfera, lo que permite la identificación de los antígenos y el láser que pasa por el filtro 488 nm excita a la PE conjugada permitiendo la detección de la cantidad de Ac específico presente en la muestra del paciente [17].

c. Electroinmunotransferencia.

Tiene la desventaja de ser cualitativa o semicuantitativa.

Se fundamenta en el reconocimiento de anticuerpos que tienen especificidad por antígenos que se absorben en una membrana (de nitrocelulosa o nylon). Los antígenos adsorbidos en la membrana fueron previamente separados en geles de poliacrilamidadodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS) y transferidos a las membranas. La unión de los anticuerpos a los antígenos específicos se detecta mediante la adición de un anticuerpo que reconoce la región Fc de las inmunoglobulinas humanas, el cual está acoplado a una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa). La unión se revela con la adición de un sustrato-cromogénico soluble el cual se precipita en el sitio donde se encuentra el complejo Ag-Ac por la acción de la enzima.

Es una técnica accesible y de fácil interpretación ya que no requiere de ningún instrumento para su lectura, pues se hace de forma visual [17].

3. Objetivos.

- 1.- Búsqueda de recursos bibliográficos relacionados con el trabajo.
- 2.- Manejo de la tecnología de Quimioluminiscencia en el diagnóstico de laboratorio.
- 3.- Estudio de anticuerpos contra dsDNA.
- 4.- Comparar la técnica de Quimioluminiscencia con la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta.
- 5.- Utilización de un método estadístico sencillo para el análisis de los resultados.
- 6.- Valorar la posibilidad de utilizar la técnica de Quimioluminiscencia como técnica “gold standard” para la detección de anticuerpos contra dsDNA.

4. Material y Métodos.

4.1. Revisión Bibliográfica.

La información expuesta en dicho estudio se basa en la búsqueda bibliográfica sistemática realizada en la base de datos Medline (PUBMED) y en la literatura derivada de libros de la sección Inmunología y Reumatología de la Biblioteca de la Facultad de Medicina de la Universidad de Zaragoza. Para ello, se han tenido en cuenta artículos publicados entre 2010 y 2017 limitando la búsqueda de éstos a lengua inglesa y artículos de habla hispana. Adicionalmente, el vocabulario ha sido controlado por los términos MeSH (Medical Subject Headings) siendo las palabras clave: “Autoimmune diseases”, “autoantibodies”, “anti-dsDNA”, “anti-ANA” “chemiluminescence”, “immunofluorescence”, “Crithidia” y “Lupus”.

Con respecto a la búsqueda se incluyen un total de 18 referencias sobre las enfermedades autoinmunes, en particular LES, los anticuerpos que podemos encontrar es esta entidad, más concretamente los anti-dsDNA así como los métodos diagnósticos disponibles en la actualidad seleccionadas según la disponibilidad de versión completa y relevancia para el estudio. Estas son: 1 Manual clínico y técnico de diagnóstico de EA, 1 capítulo de libro y 16 artículos de revista.

Respecto a los artículos de revista, estos se corresponden con un protocolo diagnóstico antes la sospecha de Lupus Eritematoso Sistémico, once revisiones bibliográficas de los cuales dos son sobre técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes, tres actualizaciones del LES: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, historia natural, pruebas diagnósticas y diagnóstico diferencial; dos revisiones sobre la utilidad de los anticuerpos Anti-dsDNA como criterios de clasificación en el LES, una revisión sobre el papel de los Anti-dsDNA como predictores de reagudización de la enfermedad de LES, y tres artículos que evalúan la detección de estos anticuerpos mediante las técnicas de Inmunofluorescencia con Crithidia y Quimioluminiscencia. Además hay cuatro artículos originales, uno de ellos evalúa la asociación de los anti-dsDNA y el complemento en la patogénesis de la enfermedad, otro valora el screening de anti-dsDNA mediante la técnica de Quimioluminiscencia, también hay una comparación entre quimioluminiscencia e inmunofluorescencia en la determinación de ANAs, y un último artículo sobre la interpretación de los resultados anti-dsDNA mediante IFI con Crithidia.

4.2. Análisis de la cohorte.

Este trabajo se ha realizado en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa.

4.2.1. Selección de las muestras.

Se ha realizado un estudio prospectivo en el que se han incluido 50 muestras (sueros) provenientes de diferentes servicios a los que se les pedía, entre otros, investigación de autoanticuerpos contra núcleo (ANA) y autoanticuerpos contra dsDNA. Las muestras fueron seleccionadas desde el mes de Enero (momento en el que se propuso el tema del trabajo) hasta el mes de Abril. Todas ellas en el contexto de un posible diagnóstico de Lupus Eritematoso Sistémico.

El criterio inmunológico de selección ha sido considerar únicamente aquellas muestras que tenían anticuerpos contra núcleo positivos (ANA). Este parámetro es más fiable que otros, incluido los anticuerpos contra dsDNA que son más inconstantes y para no condicionar el estudio ya que el objeto del mismo era comparar los resultados obtenidos de anticuerpos contra dsDNA por el método tradicional de inmunofluorescencia indirecta (*Critidia luciliae*) frente a los datos obtenidos por quimioluminiscencia para anticuerpos contra dsDNA.

A todas las muestras se les realizó un estudio de los siguientes parámetros:

- Anticuerpos contra núcleo (ANA) por inmunofluorescencia indirecta.
- Anticuerpos contra dsDNA por técnica clásica, inmunofluorescencia indirecta, contra *Critidia luciliae*.
- Anticuerpos contra dsDNA por Quimioluminiscencia.

Las 50 muestras seleccionadas fueron conservadas a -80° hasta el momento de su procesamiento por Quimioluminiscencia. Las muestras fueron analizadas en dos tandas de 25 muestras. Todas las muestras tenían previamente las determinaciones para ANA y para dsDNA.

4.2.2. Origen de la muestra.

Las muestras provienen de los diferentes servicios del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa y su zona de influencia (Hospital de Calatayud, Hospital Arzobispo Polanco de Teruel). (Tabla 3)

Origen	Nº de muestras	%
Hospital de Calatayud	8	16
Medicina Interna HCULB	24	48
Obispo Polanco Teruel	4	8
Reumatología HCULB	14	28

Tabla 3. Distribución de las muestras por servicios.

4.2.3. Datos epidemiológicos: distribución por sexo y edad.

Del las 50 muestras analizadas 11 pertenecían a hombres (22%) y 38 pertenecían a mujeres (78%).

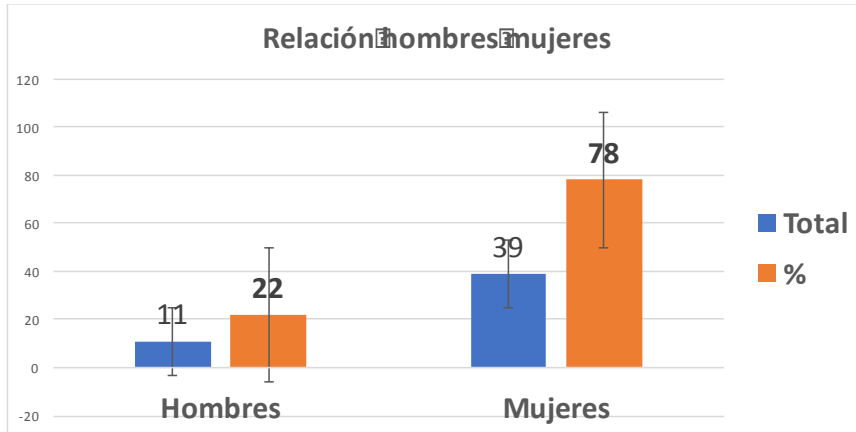
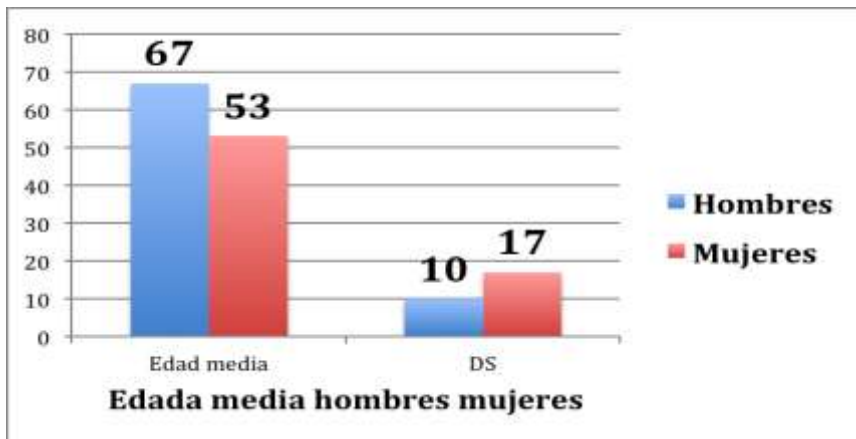


Gráfico 1. Distribución por sexo (hombres y mujeres) y su porcentaje %.

La edad media de los hombres de la muestra fue de 67 años y una desviación estándar del 10% y en el caso de las mujeres la edad media fue de 53 años con una desviación estándar 17%.



Gráfica 2. Distribución por edad según sexo y su desviación estándar.

4.3. Métodos.

4.3.1. Inmunofluorescencia Indirecta.

El procedimiento es el siguiente [14]:

- Extraer los portas del envoltorio y dejar que alcancen la temperatura ambiente.
- Aplicar diluciones de suero en los pocillos correspondientes, de forma que se cubra completamente el antígeno. Evitar tocar el sustrato con la pipeta.
- Incubar en cámara húmeda durante 30 minutos a Tª ambiente.
- Colocar los portas en soportes dentro de una cubeta llena con isotón para hacer un lavado. Colocar la cuneta en un agitador durante 5 minutos.

- Repetir el lavado otros 5 minutos.
- Secar cuidadosamente los portas con papel de filtro sin producir arrastre.
- Aplicar sobre los pocillos una gota del conjugado fluorescente FITC.
- Incubar en cámara húmeda durante 30 minutos a Tª ambiente.
- Hacer dos lavados de 5 y 10 minutos con Isotón
- Secar con papel de filtro
- Aplicar dos gotas de medio de montaje y cubreobjetos.
- Se observa la fluorescencia bajo microscopio de fluorescencia. Si las placas no se van a leer en el momento, deben guardarse en cámara húmeda y en la oscuridad.

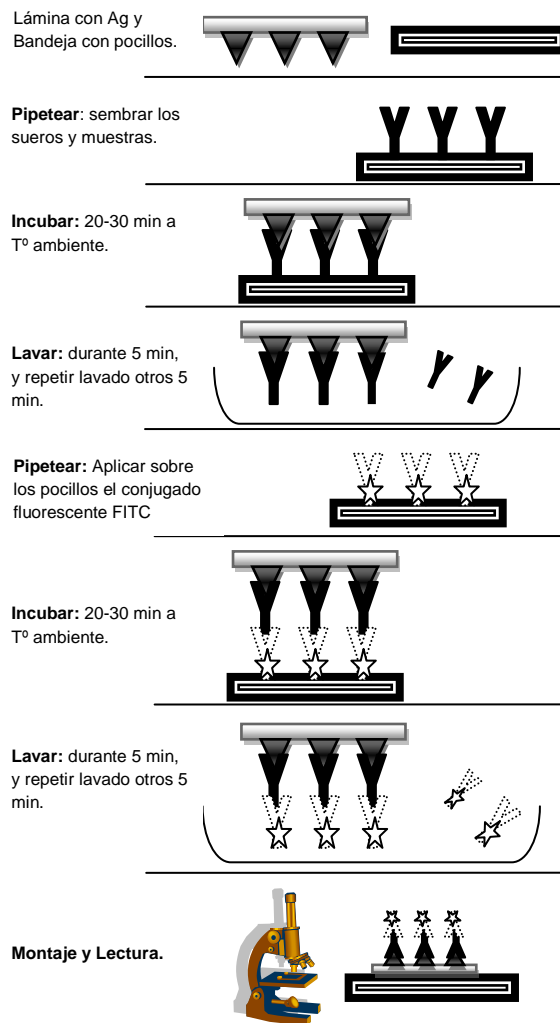


Ilustración 1. Proceso esquemático del fundamento del método de Inmunofluorescencia Indirecta [14].

a. Estudio de anticuerpos anti-nucleares.

Los anticuerpos anti-nucleares, ANA, fueron detectados por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) empleando como sustrato células HEp-2. Las células HEp-2 fueron suministradas por la casa Viro Immun en kit completo: Azul de Evans, medio de montaje (cubre/porta), PBS, Conjugado anti-IgG humana, control (+) para anticuerpos contra-núcleo (HEp-2) patrón homogéneo y control negativo para anticuerpos contra-núcleo (HEp-2) patrón homogéneo.

Para su estudio inicial se partió de una dilución de 1/80, dilución de corte habitualmente utilizada en el Servicio de Inmunología, que elimina positivos, por debajo de esta dilución, pero que no tiene significado clínico.

b. Estudio de anticuerpos anti- dsDNA

Los anticuerpos anti-dsDNA, fueron detectados por el método de inmunofluorescencia indirecta (IFI) empleando como sustrato un protozoo *Crithidia luciliae*. Las células *Crithidia luciliae* fue suministrada por la casa Viro Immun en kit completo: Azul de Evans, medio de montaje (cubre/porta), PBS, Conjugado anti-IgG humana, Control (+) para anticuerpos contra dsDNA (*Crithidia luciliae*) y control negativo para anticuerpos contra-dsDNA (*Crithidia luciliae*).

Para su estudio inicial se partió de una dilución de 1/10. Esta dilución ya es significativa como indicativo de la existencia de anticuerpos anti-dsDNA y consiguientemente puede estar asociado patología.

Dado que la técnica de inmunofluorescencia indirecta tiene un importante componente subjetivo (lectura de los portas) se optó por emplear todos los componentes complementarios de la propia casa comercial que suministró los portas.

4.3.2. Técnica de Quimioluminiscencia.

Las mediciones de anticuerpos contra dsDNA se han realizado en un sistema automático de Quimioluminiscencia “BioFlash” de la casa Americana Inova Diagnostics.

Iniciación del sistema:

- Conectar el BioFlash.
- Encender el ordenador que asiste el aparato.
- Cargar los materiales (cubetas de reacción tampones y fluidos de lavado)
- Cargar las muestras en el carrusel de muestras (Hasta 30 muestras).
- Cargar los cartuchos de reactivos.
- Las muestras y los reactivos se identifican por códigos de barras.
- Programar el test que se vaya a realizar / en este caso anticuerpos contra dsDNA)
- Comenzar el análisis.

El sistema produce el primer resultado en 30 minutos con una velocidad de proceso de 60 resultados a la hora.

Consultar resultados:

Pulsar el icono consultas. Aparecen todos los resultados que no han sido todavía archivados. El sistema permite alizar las siguientes operaciones:

- Aceptar los resultados
- Repetir algún resultado
- Imprimir un informe
- Archivar los resultados (previamente aceptados)
- Acceso a resultados archivados

Calibración del sistema:

El sistema hay que calibrarlo cuando cambie el número de lote de cada reactivo. Con cada lote de reactivos se incluyen dos niveles de calibrador; nivel 1 bajo y nivel 2 alto. Una vez sacados de la caja, los calibradores tienen que ser homogenizados agitándolos suavemente. Para realizar la

calibración cada calibrador hay que colocarlo en un soporte como si fuera una muestra más. Una vez realizada la calibración el sistema nos lo indica y lo almacena internamente. El estatus del calibrador puede comprobarse en cualquier momento. Para poder trabajar, medición de las muestras, el sistema indica la calibración realizada, validada y activada.

Mecanismo:

Dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante en presencia de algunos cofactores, reaccionan para formar un producto o intermedio de la reacción, algunas veces en presencia de un catalizador. Después, parte del producto o intermedio pasa a un estado electrónicamente excitado, que puede a continuación relajarse hasta el estado fundamental con emisión de un fotón. El sustrato es el precursor QL, que se convierte en la molécula excitada electrónicamente, responsable de la emisión de luz. El catalizador, enzima o ión metálico, reduce la energía de activación y proporciona el ambiente adecuado para la producción de una alta eficacia QL durante el proceso. La luz es directamente proporcional a la cantidad de analito.

Algunos compuestos luminiscentes que participan en muchas reacciones son: Luminol, esteroides de acridinio y lucigenina.

El equipo instrumental necesario para llevar a cabo este método analítico comprende fundamentalmente una cámara de reacción donde tiene lugar la reacción química que da lugar al estado excitado del analito, un selector de longitudes de onda para discriminar la radiación medida, un detector que genere una señal y el dispositivo de lectura de la misma.

Para su estudio inicial se partió de valores de 9'8UI, límite inferior de detección del sistema. Valores de 30 UI se establecen como umbral de corte para considerar la muestra significativa y por lo tanto indicativo de la existencia de anticuerpos anti-dsDNA, y por consiguiente asociado a patología.



Ilustración 3. Equipo instrumental de Quimioluminiscencia Bio-Flash.

5. Resultados.

5.1. Análisis de la Cohorte.

El estudio de las muestras seleccionadas ha conducido a los siguientes resultados:

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
1	+	1/640	Homogéneo	1/40	85,9
2	+	1/640	Moteado	<1/10	21
3	+	1/80	Nucleolar	1/80	9,8
4	+	1/320	Moteado	<1/10	89,9
5	+	1/80	Homogéneo	1/80	9,8
6	+	1/80	Nucleolar	1/10	9,8
7	+	1/1280	Moteado	<1/10	161,2
8	+	1/320	Moteado	1/40	159,7
9	+	1/1280	Homogéneo	120	666,9
10	+	1/320	Homogéneo	<1/10	330,9
11	+	1/320	Nucleolar	1/320	9,8
12	+	1/160	Moteado	1/10	33,5
13	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
14	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,9
15	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,8
16	+	1/1280	Homogéneo	1/20	9,8
17	+	1/160	Homogéneo	1/40	12,4
18	+	1/160	Homogéneo	1/10	14,2
19	+	1/640	Homogéneo	<1/10	246,2
20	+	1/80	Homogéneo	1/10	12,5
21	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	120
22	+	1/320	Moteado	<1/10	666,9
23	+	1/1280	Homogéneo	1/20	43
24	+	1/80	Moteado	<1/10	37,1
25	+	1/320	Homogéneo	<1/10	15,2

Tabla 4. Resultados obtenidos en 25 muestras (1-25)

En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos en las 25 primeras muestras analizadas. En esta tabla están reflejados los anticuerpos contra núcleo (ANA) con su valor (título) expresado en forma de quebrado y el patrón correspondiente. También figura el resultado obtenido de anticuerpos contra *Crithidia luciliae* (dsDNA) con su valor (título) expresado en forma de quebrado y los valores obtenidos en las mediciones de Quimioluminiscencia.

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
26	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
27	+	1/1280	Moteado	<1/10	9,8
28	+	1/640	Homogéneo	<1/10	9,8
29	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	19,4
30	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
31	+	1/80	Homogéneo	<1/10	19,3
32	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,9
33	+	1/320	Homogéneo	1/40	83,4
34	+	1/160	Moteado	1/40	21,4
35	+	1/160	Moteado	1/40	23,3
36	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
37	+	1/80	Homogéneo	<1/10	114,9
38	+	1/1280	Moteado	1/320	666,9
39	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
40	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
41	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
42	+	1/160	Moteado	<1/10	9,8
43	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
44	+	1/80	Moteado	<1/10	9,8
45	+	1/80	Moteado	<1/10	29,6
46	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
47	+	1/80	Homogéneo	<1/10	61,7
48	+	1/160	Homogéneo	<1/10	218,5
49	+	1/160	Homogéneo	110	53,5
50	+	1/320	Moteado	110	39,1

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en las 25 siguientes muestras analizadas. En esta tabla están reflejados los anticuerpos contra núcleo (ANA) con su valor (título) expresado en forma de quebrado y el patrón correspondiente. También figura el resultado obtenido de anticuerpos contra *Crithidia luciliae* (dsDNA) con su valor (título) expresado en forma de quebrado y los valores obtenidos en las mediciones de Quimioluminiscencia.

De los 50 sueros analizados, 32 sueros fueron ANA positivo que presentaban un **patrón homogéneo** (64% del total de muestras analizadas), de los cuales diez tenían un título positivo 1/80 (el título de corte mínimo), lo que representa el 31,2% del total de las muestras. Siete muestras tenían un título un poco más elevado 1/160 (21,8%). Tres de las muestras tenían un título de 1/320 (9,3%) al igual que las muestras con un título ya claramente elevado de 1/640 (9,3%). Finalmente considerar los sueros que teniendo patrón homogéneo dieron un título muy elevado 1/1280. Estos nueve sueros representan el 28,1% del total de las muestras analizadas con patrón homogéneo. En lo referente a los valores de Quimioluminiscencia, once sueros (34,3%) superan el umbral de corte establecido (30 UI). Y en cuanto a los títulos de anticuerpos contra dsDNA, once (34,3%) superan títulos iguales o superiores a 1/10 (Tabla 6).

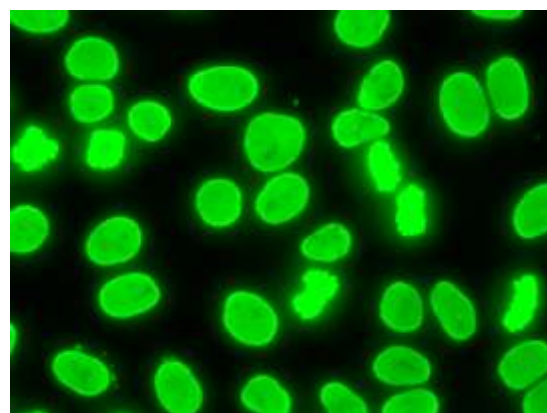


Ilustración 4. Anticuerpos contra núcleo, patrón homogéneo. Título 1/320 60X

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
1	+	1/640	Homogéneo	1/40	85,9
5	+	1/80	Homogéneo	1/80	9,8
9	+	1/1280	Homogéneo	1/20	666,9
10	+	1/320	Homogéneo	<1/10	330,9
13	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
14	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,9
15	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,8
16	+	1/1280	Homogéneo	1/20	9,8
17	+	1/160	Homogéneo	1/40	12,4
18	+	1/160	Homogéneo	1/10	14,2
19	+	1/640	Homogéneo	<1/10	246,2
20	+	1/80	Homogéneo	1/10	12,5
21	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	120
23	+	1/1280	Homogéneo	1/20	43
25	+	1/320	Homogéneo	<1/10	15,2
26	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
28	+	1/640	Homogéneo	<1/10	9,8
29	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	19,4
30	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
31	+	1/80	Homogéneo	<1/10	19,3
32	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,9
33	+	1/320	Homogéneo	1/40	83,4
36	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
37	+	1/80	Homogéneo	<1/10	114,9
39	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
40	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
41	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
43	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
46	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,8
47	+	1/80	Homogéneo	<1/10	61,7
48	+	1/160	Homogéneo	<1/10	218,5
49	+	1/160	Homogéneo	<1/10	53,5

Tabla 6. Resultados obtenidos referidos al patrón homogéneo (ANA)

De los 50 sueros analizados 15 (30%) presentaban un **patrón moteado**. De estos sueros tres (20%) tenían un título 1/80. Cinco muestras (33,35%) tenían un título un poco más elevado 1/160. Cuatro muestras (26,6%) tenían un título de 1/320. Con este patrón no aparecen muestras con títulos de 1/640. Los sueros con un título elevado (1/1280) fueron tres (20%). En lo referente a los valores de Quimioluminiscencia ocho sueros (53,3%) superaron el umbral de corte establecido 30 UI. Los títulos de anticuerpos contra dsDNA, cuatro (26,6%) superan valores iguales o superiores a 1/10 (Tabla 7)

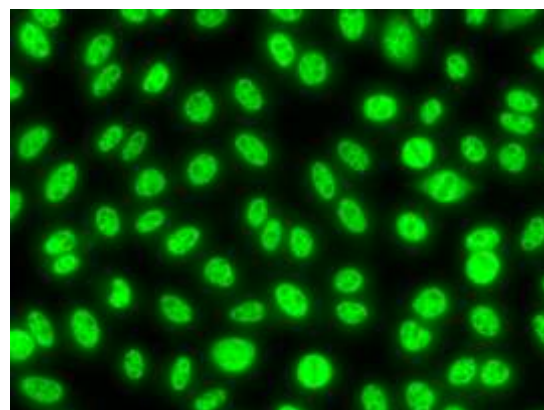


Ilustración 5. Anticuerpos contra núcleo. Patrón moteado. Título 1/160.

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
2	+	1/160	Moteado	<1/10	21
4	+	1/320	Moteado	<1/10	89,9
7	+	1/1280	Moteado	<1/10	161,2
8	+	1/320	Moteado	1/40	159,7
12	+	1/160	Moteado	1/10	33,5
22	+	1/320	Moteado	<1/10	666,9
24	+	1/80	Moteado	<1/10	37,1
27	+	1/1280	Moteado	1/10	9,8
34	+	1/160	Moteado	1/40	21,4
35	+	1/160	Moteado	1/40	23,3
38	+	1/1280	Moteado	1/320	666,9
42	+	1/160	Moteado	<1/10	9,8
44	+	1/80	Moteado	<1/10	9,8
45	+	1/80	Moteado	<1/10	29,6
50	+	1/320	Moteado	<1/10	39,1

Tabla 7. Resultados obtenidos referidos al patrón moteado (ANA)

De los 50 sueros analizados, tres (20%) presentaban un **patrón nucleolar**. De estos sueros dos (66,6%) tenían un título 1/80. Un suero (33,3%) tenía un título un poco más elevado 1/320. No hay títulos 1/640 ni superiores 1/1280. Los valores de Quimioluminiscencia en los tres sueros aparecen como < 9,8 UI que es valor límite inferior de detección del sistema. Los títulos de anticuerpos contra dsDNA, tres (100%) superan títulos iguales o superiores a 1/10 (Tabla 8).

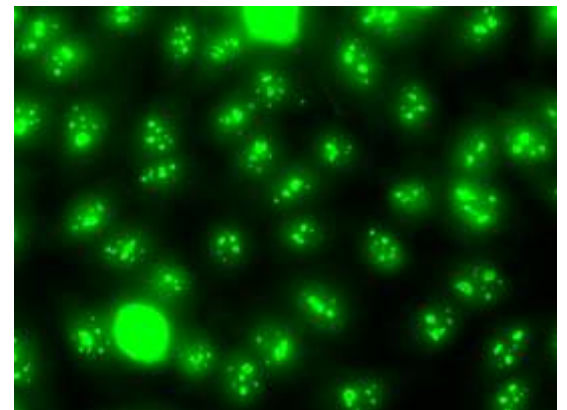


Ilustración 6. Anticuerpos contra núcleo. Patrón nucleolar. 60X Título 1/160.

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
3	+	1/80	Nucleolar	1/80	9,8
6	+	1/80	Nucleolar	1/10	9,8
11	+	1/320	Nucleolar	1/320	9,8

Tabla 8. Resultados obtenidos referidos al patrón nuclear (ANA)

Dentro de los 50 sueros analizados, 15, (30%) presentaban **títulos de ANA +1/80**. En diez de estas muestras (66,6%) el patrón era homogéneo; en tres (20%) el patrón era moteado y en otros dos (13,3%) nucleolar. Seis sueros (1/80 patrón homogéneo) tenían valores para anticuerpos contra dsDNA inferiores a 1/10. Tres de los sueros con un patrón homogéneo tenían un título de anticuerpos contra dsDNA de 1/10. Un suero tenía un título para anticuerpos contra dsDNA de 1/80. En los sueros con patrón moteado el título de anticuerpos contra dsDNA era inferior a 1/10.

En el patrón nucleolar uno de los sueros tenía un título de 1/80 para anticuerpos contra dsDNA (Tabla 9).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
5	+	1/80	Homogéneo	1/80	9,8
15	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,8
20	+	1/80	Homogéneo	1/10	12,5
31	+	1/80	Homogéneo	<1/10	19,3
32	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,9
37	+	1/80	Homogéneo	<1/10	114,9
39	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
40	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
46	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,8
47	+	1/80	Homogéneo	<1/10	61,7
24	+	1/80	Moteado	<1/10	37,1
44	+	1/80	Moteado	<1/10	9,8
45	+	1/80	Moteado	<1/10	29,6
6	+	1/80	Nucleolar	1/10	9,8
3	+	1/80	Nucleolar	1/80	9,8

Tabla 9. Resultados con ANA 1/80.

Los sueros que presentaron **un título de ANA 1/160** presentaban dos patrones, homogéneo, siete muestras (58%) y moteado, cinco muestras (42%). En el patrón homogéneo cuatro sueros tenían un título de anticuerpos contra dsDNA <1/10; dos 1/10 y uno 1/40. Los sueros con patrón moteado presentaban mas actividad de anticuerpos contra dsDNA, dos sueros <1/10, uno +1/10 y dos +1/40. Todos los sueros, menos uno, con patrón moteado tenían valores de Quimioluminiscencia > 9.8 UI. Por el contrario todos los sueros, menos dos, con patrón homogéneo tenían valores de Quimioluminiscencia > 30 UI (Tabla 10).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
13	+	1/160	Homogéneo	< 1/10	9,8
14	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,9
17	+	1/160	Homogéneo	1/40	12,4
18	+	1/160	Homogéneo	1/10	14,2
43	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
48	+	1/160	Homogéneo	<1/10	218,5
49	+	1/160	Homogéneo	1/10	53,5
2	+	1/160	Moteado	<1/10	21
12	+	1/160	Moteado	1/10	33,5
34	+	1/160	Moteado	1/40	21,4
35	+	1/160	Moteado	1/40	23,3
42	+	1/160	Moteado	<1/10	9,8

Tabla 10. Resultados de los sueros que tenían un título de anticuerpos contra-núcleo de 1/160

Los sueros con un **título de ANA +1/320** presentan un desplazamiento del patrón homogéneo, tres sueros (37,5%) hacia el patrón moteado 4 sueros (50%). Un suero, con patrón nucleolar tiene un título elevado de anticuerpos contra dsDNA +1/320, pero la Quimioluminiscencia es negativa (<9,8 UI). Tan solo uno los sueros con patrón homogéneo y otro con un patrón moteado tienen un título de anticuerpos contra dsDNA de 1/40 el resto fueron negativos. De los tres sueros con patrón homogéneo dos tenía niveles de anticuerpos detectados por Quimioluminiscencia > 30 UI y uno < 30 UI. El suero con patrón nucleolar tenía una concentración de anticuerpos por Quimioluminiscencia < 9,8 UI. Los cuatro sueros que presentaban patrón moteado tenían concentraciones de anticuerpos contra dsDNA por Quimioluminiscencia superiores a 30 UI. Uno de ellos fue > 666,9 UI el máximo valor que puede detectar el aparato (Tabla 11).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
10	+	1/320	Homogéneo	<1/10	330,9
25	+	1/320	Homogéneo	<1/10	15,2
33	+	1/320	Homogéneo	1/40	83,4
22	+	1/320	Moteado	<1/10	666,9
50	+	1/320	Moteado	<1/10	39,1
4	+	1/320	Moteado	<1/10	89,9
8	+	1/320	Moteado	1/40	159,7
11	+	1/320	Nucleolar	1/320	9,8

Tabla 11. Resultados con ANA 1/320.

Los sueros con un **título de ANA 1/640** todos presentaban un patrón homogéneo. Uno de ellos presentó un título 1/40 para anticuerpos dsDNA y dos de ellos un título < 1/10, siendo uno de ellos (muestra 28) < 9,8 en quimioluminiscencia. Los otros dos sueros tuvieron concentraciones elevadas de anticuerpos contra dsDNA por Quimioluminiscencia (Tabla 12).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
1	+	+ 1/640	Homogéneo	+ 1/40	85,9
19	+	+ 1/640	Homogéneo	<1/10	246,2
28	+	+ 1/640	Homogéneo	<1/10	9,8

Tabla 12. Resultados con ANA 1/640.

Los sueros con un **título de ANA 1/1280** (título muy elevado) de anticuerpos contra núcleo, nueve en total (12%) tenían un patrón homogéneo y de estos sueros solo tres (42,85%) presentaron un título de anticuerpos contra dsDNA >1/10, (título de 1/20). En los otros seis sueros el título de anticuerpos anti-dsDNA fue <1/10. De entre los sueros que presentaban un patrón moteado, dos de ellos tuvieron concentración de anticuerpos por Quimioluminiscencia altas o muy altas (161,2 y >666,9 UI), siendo uno de ellos anti-dsDNA negativo para IFI (muestra 7) y el otro positivo con un valor de 1/320. La mitad de los sueros (patrón homogéneo y moteado) presentaron valores de Quimioluminiscencia superiores a la concentración de corte (30UI), uno de ellos con la concentración máxima que permite detectar el aparato, 666,9 UI (Tabla 13).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
9	+	1/1280	Homogéneo	1/20	666,9
16	+	1/1280	Homogéneo	1/20	9,8
21	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	120
23	+	1/1280	Homogéneo	1/20	43
30	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
26	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
29	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	19,4
36	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
41	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
7	+	1/1280	Moteado	<1/10	161,2
27	+	1/1280	Moteado	<1/10	9,8
38	+	1/1280	Moteado	1/320	666,9

Tabla 13. Resultados con ANA 1/1280.

Del total de 50 sueros analizados 29 (58 %) tenían un **título de anticuerpos contra dsDNA <1/10**. De estos sueros 22 (69 %) tenían un patrón homogéneo. Nueve sueros (31 %) tenían un patrón moteado. Dentro de los sueros con patrón homogéneo, seis (27,27%) tenían valores para Quimioluminiscencia >30UI. En el caso de los sueros con patrón moteado, cuatro (44,4%) sueros alcanzaban valores >30UI de Quimioluminiscencia (Tabla 14).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
13	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
26	+	1/2560	Homogéneo	<1/10	9,8
27	+	1/1280	Moteado	<1/10	9,8
28	+	1/640	Homogéneo	<1/10	9,8
30	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
36	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
39	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
40	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
41	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
42	+	1/160	Moteado	<1/10	9,8
43	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
44	+	1/80	Moteado	<1/10	9,8
46	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
14	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,9
25	+	1/320	Homogéneo	<1/10	15,2
31	+	1/80	Homogéneo	<1/10	19,3
29	+	1/2560	Homogéneo	<1/10	19,4
2	+	1/160	Moteado	<1/10	21
45	+	1/80	Moteado	<1/10	29,6
24	+	1/80	Moteado	<1/10	37,1
47	+	1/80	Homogéneo	<1/10	61,7
4	+	1/320	Moteado	<1/10	89,9
37	+	1/80	Homogéneo	<1/10	114,9
21	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	120

7	+	1/1280	Moteado	<1/10	161,2
48	+	1/160	Homogéneo	<1/10	218,5
19	+	1/640	Homogéneo	<1/10	246,2
10	+	1/320	Homogéneo	<1/10	330,9
22	+	1/320	Moteado	<1/10	666,9

Tabla 14. Resultados DNA título <1/10.

Los sueros que presentaron un **título 1/10 de anticuerpos contra dsDNA**, cinco tenían un patrón homogéneo (62,5%), dos tenían patrón moteado y uno nucleolar. Los dos sueros con patrón moteado y uno con patrón homogéneo tenían una concentración de anticuerpos detectados por Quimioluminiscencia superior al punto de corte (muestra 49 patrón homogéneo: 53,5 UI; muestra 50 y 12 con patrón moteado, 39,1UI y 33,5UI respectivamente) (Tabla 15).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
6	+	1/80	Nucleolar	1/10	9,8
15	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,8
20	+	1/80	Homogéneo	1/10	12,5
18	+	1/160	Homogéneo	1/10	14,2
32	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,9
49	+	1/160	Homogéneo	1/10	53,5
50	+	1/320	Moteado	1/10	39,1
12	+	1/160	Moteado	1/10	33,5

Tabla 15. Resultados DNA título +1/10

Los sueros con un título **de anticuerpos contra dsDNA 1/20** tienen un patrón homogéneo y niveles altos de anticuerpos contra núcleo (1/1280). Uno de los sueros (muestra 9) tiene una concentración de anticuerpos por Quimioluminiscencia de 666,9 UI, muy elevados (Tabla 16).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
9	+	1/1280	Homogéneo	1/20	666,9
16	+	1/1280	Homogéneo	1/20	9,8
23	+	1/1280	Homogéneo	1/20	43

Tabla 16. Resultados DNA título +1/20.

Los seis sueros con un **título de anticuerpos contra dsDNA 1/40**, presentan tres patrones homogéneos y tres patrones moteado. Dos de los sueros con patrón homogéneo tenían valores de anticuerpos contra dsDNA elevados y uno de los sueros con patrón moteado tiene un título elevado (159,7 UI) por Quimioluminiscencia (Tabla 17).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
1	+	1/640	Homogéneo	1/40	85,9
17	+	1/160	Homogéneo	1/40	12,4
33	+	1/320	Homogéneo	1/40	83,4
34	+	1/160	Moteado	1/40	21,4
35	+	1/160	Moteado	1/40	23,3
8	+	1/320	Moteado	1/40	159,7

Tabla 17. Resultados DNA título 1/40.

Los sueros con un **título de anticuerpos contra dsDNA 1/80**, son similares en los resultados por los tres métodos; difieren únicamente en el patrón: nucleolar y homogéneo (Tabla 18).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
3	+	1/80	Nucleolar	1/80	9,8
5	+	1/80	Homogéneo	1/80	9,8

Tabla 18. Resultados DNA título 1/80.

Los sueros que presentan el **título más elevado** utilizando inmunofluorescencia indirecta con *Crithidia luciliae* (**1/320**) corresponde a un patrón moteado, con títulos anti-dsDNA elevados por Quimioluminiscencia, y a un patrón nucleolar, negativo para Quimioluminiscencia. (Tabla 19).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
11	+	1/320	Nucleolar	1/320	9,8
38	+	1/1280	Moteado	1/320	666,9

Tabla 19. Resultados DNA título 1/320.

Cuando seleccionamos los resultados obtenidos sobre los valores de **Quimioluminiscencia <30UI** nos encontramos que hay un total de 31 sueros de los cuales 21 (67,74%) presentan un patrón homogéneo, siete (22,58) tienen un patrón moteado y en tres (9,67%) el patrón es nucleolar. Los sueros con patrón homogéneo y anticuerpos contra dsDNA, con valores \geq a 1/10 detectados son 7 (33,33%) y con valores $<$ 1/10 son 14 (66,67%). Los sueros que presentan un patrón moteado son siete (22,58%) y de estos cinco tenían valores de anticuerpos contra dsDNA $<$ 1/10 (71,42%) y dos (28,57%) tenían valores de anticuerpos contra dsDNA $>$ 1/10. El patrón nucleolar, tres sueros (9,67%) Todos presentaba valores de anticuerpos contra dsDNA $>$ 1/10 (Tabla 20).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
3	+	1/80	Nucleolar	1/80	9,8
5	+	1/80	Homogéneo	1/80	9,8
6	+	1/80	Nucleolar	1/10	9,8
11	+	1/320	Nucleolar	1/320	9,8
13	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
15	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,8
16	+	1/1280	Homogéneo	1/20	9,8
26	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
27	+	1/1280	Moteado	<1/10	9,8
28	+	1/640	Homogéneo	<1/10	9,8
30	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
36	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
39	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
40	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
41	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	9,8
42	+	1/160	Moteado	<1/10	9,8
43	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,8
44	+	1/80	Moteado	<1/10	9,8
46	+	1/80	Homogéneo	<1/10	9,8
14	+	1/160	Homogéneo	<1/10	9,9
32	+	1/80	Homogéneo	1/10	9,9
17	+	1/160	Homogéneo	1/40	12,4
20	+	1/80	Homogéneo	1/10	12,5
18	+	1/160	Homogéneo	1/10	14,2
25	+	1/320	Homogéneo	<1/10	15,2
31	+	1/80	Homogéneo	<1/10	19,3
29	+	1/2560	Homogéneo	<1/10	19,4
2	+	1/160	Moteado	<1/10	21
34	+	1/160	Moteado	1/40	21,4
35	+	1/160	Moteado	1/40	23,3
45	+	1/80	Moteado	<1/10	29,6

Tabla 20. Resultados referidos a QL inferior a 30 IU

En los sueros con valores **Quimioluminiscencia >30UI** solamente se detectan dos tipos de patrones, homogéneo y moteado; el nucleolar desaparece de los patrones encontrados. Se detectan 19 sueros con valores > 30UI de Quimioluminiscencia de los cuales once (57,89%) tienen un patrón homogéneo, de estos, seis tienen valores < 1/10 en anticuerpos contra dsDNA por inmunofluorescencia y cinco presentan valores >1/10 por inmunofluorescencia (Tabla 21).

Muestra	ANA	Título ANA	Patrón	DNA	QL
12	+	1/160	Moteado	1/10	33,5
24	+	1/80	Moteado	<1/10	37,1
50	+	1/320	Moteado	1/10	39,1
23	+	1/1280	Homogéneo	1/20	43
49	+	1/160	Homogéneo	1/10	53,5
47	+	1/80	Homogéneo	<1/10	61,7
33	+	1/320	Homogéneo	1/40	83,4
1	+	1/640	Homogéneo	1/40	85,9
4	+	1/320	Moteado	<1/10	89,9
37	+	1/80	Homogéneo	<1/10	114,9
21	+	1/1280	Homogéneo	<1/10	120
8	+	1/320	Moteado	1/40	159,7
7	+	1/1280	Moteado	<1/10	161,2
48	+	1/160	Homogéneo	<1/10	218,5
19	+	1/640	Homogéneo	<1/10	246,2
10	+	1/320	Homogéneo	<1/10	330,9
9	+	1/1280	Homogéneo	1/20	666,9
22	+	1/320	Moteado	<1/10	666,9
38	+	1/1280	Moteado	1/320	666,9

Tabla 21. Resultados referidos a QL superior a 30 IU

Todos los sueros estudiados son ANA positivos y tienen anticuerpos contra núcleo; la mayoría de ellos con un patrón homogéneo, el 64%. La mayoría con anti-dsDNA por IFI \leq 1/10, exceptuando once muestras que tienen un título \geq 1/10, que es el título que confiere valor clínico y en la mayoría de las veces también diagnóstico a los anticuerpos contra-dsDNA. Que ocurre con los anticuerpos contra-dsDNA $<$ 1/10, si los comparamos con los valores de Quimioluminiscencia, pues que sólo siete muestras tienen títulos superiores a 30UI. Hay títulos de ANA elevados, nueve tiene un título de 1/1280, muy elevado, de los cuales únicamente cinco están dentro de los sueros que presentan valores de Quimioluminiscencia superiores a 30UI.

Si tomamos como referencia los anticuerpos contra-dsDNA nos encontramos con que 11 sueros tiene valores de quimioluminiscencia superiores a 30UI y de entre esos once sueros solamente hay cinco que tiene anticuerpos contra-dsDNA $>$ 1/10, luego la combinación ANA positivo, patrón homogéneo, Quimioluminiscencia $>$ 30UI no correlaciona con los valores obtenidos con inmunofluorescencia indirecta sobre *Crithidia lucillae*

Cuando seleccionamos el patrón moteado y comparamos los valores de Quimioluminiscencia superiores a 30UI y los referimos a los anticuerpos contra-dsDNA, ocurre algo parecido; los valores que se han obtenido son muy bajos o negativos. Únicamente un suero presenta un título anticuerpos contra-dsDNA de 1/320. Los valores de ANA son elevados, hay dos con un título de 1/1280. Dos sueros muestras 22 y 38 presentaban resultados dispares. Por un lado, la muestra 22 es ANA+ 1/320, patrón moteado, Quimioluminiscencia $>$ 668,9 UI y los anticuerpos contra-dsDNA $<$ 1/10, mientras que en el suero muestra 38, los anticuerpos ANA + es 1/1280, el patrón es moteado, la Quimioluminiscencia $>$ 666,9 y los anticuerpos contra-dsDNA son elevados 1/320. La muestra 22 presenta una clara contradicción de resultados, previsiblemente los anticuerpos contra-dsDNA deberían ser mas elevados, o el resultado puede ser erróneo. Ciertamente tampoco

se pueden sacar muchas conclusiones ya que se trata únicamente de un solo suero y el patrón moteado en principio no es buen candidato para que se puedan correlacionar resultados de Quimioluminiscencia y los obtenidos sobre *Crithidia luciliae*.

En el patrón nucleolar, solamente tres sueros, se encontraron valores positivos para anticuerpos contra-dsDNA, uno de ellos elevado (1/320), pero los resultados obtenidos por Quimioluminiscencia fueron <9,8UI

El análisis de los sueros con títulos de ANA 1/80 revela que solamente seis tiene anticuerpos contra-dsDNA, siendo el resto negativos (<1/10). Aparecen tres sueros que tienen valores de Quimioluminiscencia >30UI, dos con patrón homogéneo uno patrón moteado pero los tres son ADN <1/10. El patrón moteado u homogéneo con anticuerpos ANA +1/80 no permite establecer una buena relación anticuerpos contra núcleo y los anticuerpos contra dsDNA. Solamente hay tres sueros (muestras 37, 24 y 47) que presentaban valores >30UI por Quimioluminiscencia y que son negativos para dsDNA, por lo que la relación DNA/Quimioluminiscencia no es buena.

Los sueros que presentaban un título para anticuerpos antinucleares 1/160, los resultados son similares a los anteriormente descritos en los ANA 1/80. Hay tres sueros que tiene Quimioluminiscencia > 30UI de los cuales uno era DNA 1/10 y Quimioluminiscencia más baja de los tres, 35UI. De los ocho sueros con ADN >1/10, siete tenían valores de Quimioluminiscencia inferiores a 30UI. La correlación tampoco es satisfactoria

Los sueros con títulos ANA 1/320 tienen valores de Quimioluminiscencia elevados >30UI, excepto dos (muestra 25 y 11). Dos de esto sueros, muestras 10 y 22, fueron negativos para anticuerpos contra-dsDNA por IFI, independientemente del patrón obtenido, pero tenían valores elevadísimos por Quimioluminiscencia. La muestra 11, patrón nucleolar, tenía un elevado título de anticuerpos por *Crithidia luciliae* 1/320, pero era negativo por Quimioluminiscencia.

Los ANA con un título elevado 1/640, patrón homogéneo, uno era negativo por Quimioluminiscencia y *Crithidia*. Los otros dos los resultados fueron dispares un DNA <1/10 con Quimioluminiscencia elevada (246.2 UI) y el otro tenía un DNA elevado 1/40 y Quimioluminiscencia > 30UI.

No hay una buena correlación entre los sueros que tenían un título de ANA muy elevado (1/1280) y los datos obtenidos de anticuerpos contra-dsDNA. Solamente un suero tiene un título elevado DNA 1/320 con una Quimioluminiscencia >666,9 y patrón moteado. Tres sueros más tuvieron un título ADN 1/20. Uno de ellos con una Quimioluminiscencia >666,9, otro de 43 UI y un tercero de 9,8UI. No parece posible a tenor de los resultados analizados hasta ahora que se puede establecer una correlación entre anticuerpos DNA y valores de Quimioluminiscencia, posiblemente por la propia naturaleza antigénica del ADN (*Ghirardello et al.[16]*).

Dentro de los sueros que son DNA <1/10, diez tiene valores de Quimioluminiscencia que son superiores a 30UI. Algunos como el suero 22 es negativo para anticuerpos contra-dsDNA y tiene un valor de Quimioluminiscencia de 666,9 UI, que indica una completa discrepancia. El resto de los sueros de esta serie son negativos para DNA por IFI y Quimioluminiscencia.

Entre los sueros con un valor mínimo +1/10 DNA solamente hay uno que es positivo, con un valor bajo 33,5 UI por Quimioluminiscencia. Digamos que ambos resultados podrían ser cuestionables y la serie, cinco sueros podía ser toda negativa por Quimioluminiscencia, estando el límite de corte en 30UI.

En la serie de sueros DNA con títulos 1/20, encontramos uno, la muestra 9, que tiene un valor máximo en Quimioluminiscencia (666,9), lo que tampoco resulta demostrativo y el valor de Quimioluminiscencia no encajaría con el valor ADN.

Los sueros que tuvieron anticuerpos contra-dsDNA a título elevado +1/40 (seis en total) mejoran un poco en su correspondencia con los valores encontrados en los mismos sueros por Quimioluminiscencia. Tres de estos sueros eran claramente positivos con valores < 30UI.

Los sueros con valores de anticuerpos contra-dsDNA 1/80, elevados, tiene una correlación nula con Quimioluminiscencia, valores en esta última <9,8 UI.

Finalmente los sueros con anticuerpos contra-dsDNA a título muy elevado (1/320) y poco frecuentes, donde cabría esperar títulos muy elevados de Quimioluminiscencia, solamente uno (666.9UI) cumpliría esa expectativa.

Los resultados desde un punto de vista operativo y de aplicación clínica los podríamos resumir agrupándolos en correlaciones y perfiles tal y como se muestran en las tablas 22 y 23.

Anticuerpos anti-dsDNA Crithidia luciliae IFI	Anticuerpos anti-dsDNA Quimioluminiscencia	Total sueros	Correlación
Positivos	Negativos	12	A
Positivos	Positivos	9	B
Negativos	Positivos	10	C
Negativos	Negativos	19	D

Tabla 22. Comparación entre los dos métodos Inmunofluorescencia y Quimioluminiscencia.

Anticuerpos contra núcleo ANA	Anticuerpos anti-dsDNA Crithidia luciliae Inmunofluorescencia indirecta	Anticuerpos anti-dsDNA Quimioluminiscencia	Total sueros	Perfil
Positivos	Positivos	Positivos	9	1
Positivos	Negativos	Positivos	10	2
Positivos	Positivos	Negativos	12	3
Positivos	Negativos	Negativos	19	4

Tabla 23. Perfiles encaminados a un mejor diagnóstico del Lupus Eritematoso Sistémico.

6. Discusión.

Uno de los objetivos de este trabajo era comprobar la posible utilidad de la Quimioluminiscencia para determinar anticuerpos anti-dsDNA y eventualmente situar este procedimiento en el contexto de la técnica más empleada, la Inmunofluorescencia indirecta. El estudio de los anticuerpos contra núcleo (ANA), con sus diferentes patrones y el estudio de anticuerpos anti-DNA utilizando como sustrato *Crithidia luciliae*; se han mostrado a lo largo del tiempo como útiles y eficaces en el estudio de las enfermedades autoinmunes y concretamente en el Lupus Eritematoso Sistémico. La correlación A, Inmunofluorescencia positiva y Quimioluminiscencia negativa (12 sueros del total de muestras analizadas) podría ser aceptable en aquellos sueros con títulos 1/10; la Inmunofluorescencia es finalmente una técnica de observación subjetiva y no está exenta a los errores del observador. Pero en el resto de los sueros con valores > 1/10, hay una clara discrepancia. La correlación B, sueros positivos por ambas técnicas (9 sueros en total) podríamos dar por buenos los resultados obtenidos en estas condiciones independientemente de los valores resultantes por una u otra técnica. En la correlación C, sueros negativos por Inmunofluorescencia indirecta y positivos por Quimioluminiscencia sería cuestionable que se pudieran dar por buenos estos resultados en un contexto del diagnóstico de un Lupus. La correlación D, sueros negativos por ambas técnicas son los mejores resultados desde el punto de una buena correlación. Si ambas técnicas son negativas se puede decir que no se detectan anticuerpos anti-dsDNA.

Pero como ya es conocido en el laboratorio una sola prueba no aporta la definición absoluta de una determinada patología. No existe la prueba perfecta que “in vitro” puede dar una orientación absoluta de un determinado diagnóstico. En este sentido si es cierto que los anticuerpos contra dsDNA, por no encontrarse en prácticamente en otros procesos patológicos, su presencia si que es un buen indicativo de correlación con la enfermedad.

Los resultados obtenidos nos han permitido establecer cuatro tipos diferentes de perfiles. En el perfil 1 las tres determinaciones son positivas (ANA, dsDNA y Quimioluminiscencia). Como sabemos la correlación entre anticuerpos anti-ANA y anti-dsDNA siempre ha sido buena, de hecho las dos pruebas positivas son indicativas de LES. Dado que la Quimioluminiscencia aparece también positiva en nueve sueros, en este caso hay una buena correlación y el diagnóstico se vería reforzado. El perfil 2, ANA positivo, DNA negativo por IFI y Quimioluminiscencia positiva; en teoría y este ha sido el objetivo de este trabajo, el resultado de Quimioluminiscencia deberíamos darlo por bueno junto a los ANA, pero en estos momentos esto estaría vulnerando la ortodoxia del sistema y sería muy cuestionable que pudiésemos, desde un punto de vista clínico asimilar el resultado con un lupus, salvo que la clínica así lo indicase, como demostró *Monteiro Callado MR et al.* [11]. El perfil 3 es el clásico ANA positivos, DNA positivo por IFI y DNA por Quimioluminiscencia negativa. Perfil 4, las dos pruebas, ANA y Quimioluminiscencia son negativas. El resultado para la búsqueda de anticuerpos contra dsDNA lo podemos considerar como negativo. Sería esta la situación más favorable para la utilización de Quimioluminiscencia en la investigación de anticuerpos anti-dsDNA.

7. Conclusiones.

- 1) Un resultado positivo por Quimioluminiscencia puede considerarse válido cuando es positiva la Inmunofluorescencia indirecta sobre *Crithidia luciliae*.
- 2) Un resultado negativo por Quimioluminiscencia puede considerarse válido cuando es negativa la Inmunofluorescencia indirecta sobre *Crithidia luciliae*.

- 3) El empleo de la técnica de Quimioluminiscencia en la búsqueda de anticuerpos contra-dsDNA resulta útil para discriminar los resultados negativos.
- 4) No se puede prescindir de la inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpos contra dsDNA.
- 5) La Quimioluminiscencia no puede sustituir a la inmunofluorescencia indirecta para la investigación de anticuerpos contra-dsDNA.

8. Bibliografía.

1. Enríquez E, Kanaffo S, Lozano F. Protocolo diagnóstico ante la sospecha de lupus eritematoso sistémico. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2017 2; 12(25):1463-1466.
2. Galindo M, Molina RA, Álvarez JLP. Lupus eritematoso sistémico (I). Etiopatogenia. Manifestaciones clínicas. Historia natural. Pruebas diagnósticas. Diagnóstico diferencial. *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado* 2017 2;12(25):1429-1439
3. Mahler M, Bentow C, Serra J, Fritzler M.J. Detection of autoantibodies using chemiluminescence technologies. 2016 Nov 2; 38 (1):14-20.
4. Adinolfi A, Valentini E, Calabresi E, Tesei G, Signorini V, Barsotti S, et al. One year in review 2016: systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2016 Jul-Aug; 34(4):569-574.
5. Floris A, Piga M, Cauli A, Mathieu A. Predictors of flares in Systemic Lupus Erythematosus: Preventive therapeutic intervention based on serial anti-dsDNA antibodies assessment. Analysis of a monocentric cohort and literature review. *Autoimmun Rev* 2016 Jul;15(7):656-663
6. Kaul A, Gordon C, Crow MK, Touma Z, Urowitz MB, van Vollenhoven R, et al. Systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Dis Primers* 2016 Jun 16;2:16039.
7. González DA, Varela AR, Rodríguez IM, Vera AG, Sánchez MD, Esquivel AA, et al. Anti-dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus: A combination of two quantitative methods and the ANA pattern is the most efficient strategy of detection. *J Immunol Methods* 2015;427:30-35.
8. Infantino M, Meacci F, Bentow C, Martis P, Benucci M, Afeltra A, et al. Clinical comparison of QUANTA Flash dsDNA chemiluminescent immunoassay with four current assays for the detection of anti-dsDNA autoantibodies. *Journal of immunology research* 2015;2015.
9. López Longo FJ. Significado de los Autoanticuerpos en las Enfermedades Reumáticas Sistémicas. *Manual SER de diagnóstico y tratamiento de las enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas*. Madrid: Elsevier; 2015. p. 9-16.
10. Rekvig OP. Anti-dsDNA antibodies as a classification criterion and a diagnostic marker for systemic lupus erythematosus: critical remarks. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology*. 2014 Jan;1(179):5-10.
11. Callado MR, Lima JR, Barroso MN, Pinheiro AT, da Cruz Neto MF, Abreu MA, et al. Usefulness of anti-dsDNA antibody screening with chemiluminescence followed by confirmation by indirect immunofluorescence. *Rev Bras Reumatol* 2013 Sep-Oct;53(5):412-418

12. Giles BM, Boackle SA. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Res* 2013 Mar;55(1-3):10-21
13. Rivero-Jiménez RA. Una mirada al diagnóstico de laboratorio de las enfermedades autoinmunes. *Revisita Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2013;29(2)
14. Lopez García MJ, Urbano Felices A, Cárdenas Povedano M, Osuna Molina A, Lendinez Ramírez AM. Manual de laboratorio en las enfermedades Autoinmunes. Omniascence. 2012. (1): 1-75.
15. Soda P, Onofri L, Iannello G. A decision support system for Crithidia Luciliae image classification. *Artif Intell Med* 2011 1; 51(1):67-74.
16. Ghirardello A, Villalta D, Morozzi G, Afeltra A, Galeazzi M, Gerli R, et al. Diagnostic accuracy of currently available anti-double DNA antibody assays. An Italian multicentre study, *Clin. Exp. Rheumatol.* 2011; 29, 50.
17. Hernández Ramírez DF, Cabiedes J. Técnicas inmunológicas que apoyan el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes. *Reumatología Clínica* 2010 0;6(3):173-177
18. Lima Munive MR, Domínguez JIS, Solís RG, Botello MES, Observatorio CMA. Comparación entre quimioluminiscencia e inmunofluorescencia indirecta en la determinación de anticuerpos antinucleares. *Rev Mex Patol Clin* 2010;57(2):100-104

9. Anexos.

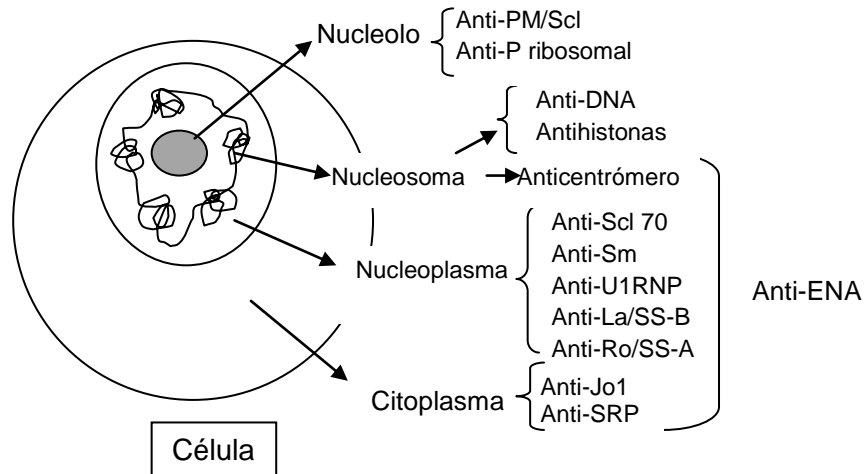


Ilustración 1. Estructuras celulares que generan anticuerpos [14]

Estructura celular	Antígeno	Anticuerpo
NUCLEOSOMA	Cromatina	
	DNA doble cadena	Anti-dsDNA
	DNA cadena sencilla	Anti-ssDNA
	DNA nativo (doble cadena)	Anti-nDNA
	H1, H2A, H2B, H3, H4, H5	Antihistonas
NUCLEOLO	r DNA → RNA	
	P100	Anti-PM/Scl
	RNA polimerasa I	Anti-RNA polimerasa I
	r RNA 2' Ometiltransferasa, componente principal de U3-RNP	Anti-Fibrilarina (= anti Scl-34)
NUCLEOPLASMA	Proteínas no histonas asociadas al DNA	
	CenpB (nucleosoma)	Anticentrómero
	DNA –Topoisomerasa I	Anti- Scl 70
	Antígeno celular proliferación nuclear (factor de la DNA polimerasa δ)	Anti-PCNA
	Proteínas alta movilidad	Anti-HMG-17
	Subunidad reguladora DNA-proteinkinasa (p70/80)	Anti-Ku
	Helicasa nuclear, regula la transcripción	Anti-Mi-2β
	Proteínas no histonas asociadas al RNA	
	UnRNP =UnRNA +Prot	Anti-Sm
	U ₂ RNP = U ₂ RNA + prot A',B'..	Anti-U ₂ RNP
	U ₁ RNP =U ₁ RNA +prot 70..	Anti-U ₁ RNP
	La: fp47	Anti-SS-B/La
	Ro: p60 y p52	Anti-SS-A/Ro
	RNA-pol II	Anti-RNA-pol II
RNA-pol III	Anti-RNA-pol III	
CITOPLASMA	Proteínas no histonas asociadas al RNA	
	Ro	Anti-SS-A
	P0, P1, P2	Anti-Ribosomal
	Histidil-Trna-sintetasa	Anti-Jo1
	Treonil-tRNA-sintetasa	Anti-PL-7
	Alanil-tRNA-sintetasa	Anti-PL-12
	Glicil-tRNA-sintetasa	Anti-EJ
	Isoleucil-tRNA-sintetasa	Ati-OJ
	Partícula de Reconocimiento de Señal	Anti-SRP

Tabla 1. Clasificación de los Autoanticuerpos de las Enfermedades del tejido conjuntivo [14].

Reactivo	Título	Sustrato	Conjugado
ANA, AMA	1/80	Células Hep-2 fijadas a un porta (son células epiteliales humanas procedentes de carcinoma de laringe)	FITC IgG conjugadas
ASMA, APCA	1/40	Cortes de estómago de rata o ratón, fijados a un porta	FICT alta sensibilidad IgG conjugado
n DNA	1/10	Crithidia lucilliae	FITC IgG conjugado
RETICULINA	1/10	Riñón de rata	FITC IgG conjugado
ENDOMISIO	1/10	Esófago de mono	FITC IgA conjugado
Ac Antimúsculo estriado	1/10	Músculo estriado de mono o rata	FICT alta sensibilidad IgG conjugado
Ac Antimembrana basal	1/10	Esófago de mono	FICT alta sensibilidad IgG conjugado
Ac anti células de ovario	1/10	Cortes de ovario de mona.	FICT alta sensibilidad IgG conjugado
Ac Antisuprarrenales	1/10	Adrenal de mono.	FICT alta sensibilidad IgG conjugado

Tabla 2. Reactivos son sus sustratos y conjugados para técnica de IFI