

Análise da reatividade do padrão anéis e bastões em diferentes kits FAN HEp-2

Reactivity analysis of “rods and rings” pattern in different HEp-2 ANA kits

Bruno de Assis Coelho¹, Carla Márcia Leal Lunardi¹, Glauco Frederico Rodrigues Pimenta¹, Maria Luiza Peloso Maia¹, Paulo Henrique Brasil Vieira¹, Rômulo Carvalho Vaz de Melo²

DOI: 10.5935/2238-3182.20160028

RESUMO

¹ Acadêmico (a) do Curso de Medicina. Fundação José Bonifácio Lafayette de Andrada – FUNJOBE. Faculdade de Medicina de Barbacena – FAME. Barbacena, MG – Brasil.

² Professor. FUNJOBE/FAME. Barbacena, MG – Brasil.

Objetivo: comparar a reatividade para o padrão “anéis e bastões” em diferentes *kits* comerciais de fator antinúcleo (FAN) HEp-2. **Metodologia:** foram analisadas três amostras sorológicas com sabida reatividade para o padrão “anéis e bastões”, em cinco *kits* comerciais de FAN HEp-2. **Resultados:** dos cinco *kits* comerciais testados, dois – EUROIMMUN® E INOVA® – apresentaram reatividade para o padrão “anéis e bastões” e três – WAMA®, VIROIMMUN® e BION® – não mostraram reatividade. **Conclusão:** os diferentes *kits* comerciais de FAN HEp-2 disponíveis no mercado não têm homogeneidade na reatividade para o padrão “anéis e bastões”.

Palavras-chave: Imunofluorescência; FAN HEp-2.

ABSTRACT

Objective: In order to compare the reactivity of ANA (Antinuclear Antibodies) “rods and rings” in different HEp-2 cell substrates using five different commercial kits immunofluorescence try to investigate the standardization of these kits. **Methods:** In this study 3 serum samples were analyzed with known reactivity to the default “rods and rings” obtained in the industry Soroimunologia and Hormones Laboratório Geraldo Lustosa in Belo Horizonte, 5 commercial kits ANA HEp-2. **Results:** In these three serological kits - VIROIMMUN®, BION® and WAMA® – no reactivity to the standard rods and rings HEp-2 and two serological kits - EUROIMMUN® and INOVA® - found reactivity. **Conclusion:** Different commercial kits of ANA HEp-2 available in the market do not present homogeneous reactivity to the standard rings and rods.

Keywords: Fluorescent Antibody Technique; ANA HEp-2.

INTRODUÇÃO

A pesquisa de autoanticorpos pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI), também denominada fator antinúcleo (FAN), foi descoberta em meados do século XX pelos pesquisadores Coons e Kaplan. O método era baseado na detecção de anticorpos que reagem a antígenos nas células e nos órgãos de portadores de doenças autoimunes, em amostra de tecido de roedores. Posteriormente, esse substrato foi substituído por células tumorais derivadas de carcinoma de laringe humana - células HEp-2,^{1,2} o que possibilitou a análise minuciosa dos compartimentos celulares e os anticorpos neles depositados que podem ocorrer em núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico.³ Após essa modificação houve grande aumento na sensibilidade

Instituição:
Faculdade de Medicina de Barbacena
Barbacena, MG – Brasil

Autor correspondente:
Rômulo Vaz de Melo
E-mail: romulovm@gmail.com

do teste, ampliando de forma significativa o número de padrões de FAN que podem ser detectados.

A pesquisa de autoanticorpos pelo FAN HEP-2 em imunofluorescência indireta (IFI) é hoje o teste laboratorial de escolha na investigação inicial de doenças autoimunes^{4,5} e tem sido amplamente utilizada por médicos de várias especialidades no diagnóstico precoce de doenças autoimunes, como LES, esclerose sistêmica, síndrome de Sjögren, artrite reumatoide, doença mista do tecido conjuntivo, polimiosite, síndrome antifosfolípide e outras.^{6,7} Todavia, a prescrição indiscriminada do exame, sem critérios clínicos para a indicação do teste, levou ao aumento no número de resultados positivos em pacientes hígidos, devido ao fato de que a presença de autoanticorpos não é específica de autoimunidade, pois condições inflamatórias crônicas, neoplasias, entre outros, podem cursar com autoanticorpos.

No mercado laboratorial existem diversas marcas que se destinam à pesquisa de autoanticorpos pelo método de FAN HEP-2 e, apesar de haver certo grau de padronização entre os diferentes *kits*, os resultados encontrados com um substrato HEP-2 de um fornecedor nem sempre vai ser reproduzido com outro, mostrando que ainda se necessita de mais padronização por parte dos fabricantes. Dessa forma, estudos que avaliam o grau de concordância dos *kits* na demonstração dos padrões são extremamente relevantes.⁸

Um dos padrões de FAN que não apresentam boa concordância entre os diversos substratos é “anéis e bastões”, padrão descrito recentemente, comumente associado a portadores de hepatite por vírus C. É comum que esse padrão seja expresso em um substrato e não em outro, fazendo com que o mesmo paciente possa ter resultados distintos quando realizados em laboratórios que utilizam *kits* comerciais diferentes.^{4,9}

Desse modo, este estudo objetiva comparar a reatividade para o padrão “anéis e bastões” em diferentes *kits* comerciais de fator antinúcleo (FAN) HEP-2.

METODOLOGIA

Delineamento do estudo

Trata-se de estudo transversal analítico utilizando-se amostras sorológicas de pacientes que realizaram exames laboratoriais de rotina oriundas do laboratório Geraldo Lustosa, em Belo Horizonte. As análises para comparar a reatividade do padrão de FAN anéis e bastões em cinco *kits* diferentes utilizando

do substratos de células HEP-2 foram realizadas no Setor de Soroimunologia e Hormônios do Laboratório São José, em Barbacena.

Amostras

Para a realização do estudo, foram analisadas amostras sorológicas obtidas do sangue de pacientes que compareceram ao laboratório Geraldo Lustosa, em Belo Horizonte, para exames laboratoriais de rotina. As amostras foram transportadas em veículo de empresa terceirizada, especializada em transporte de material biológico, à temperatura de -12°C. A partir das amostras do referido laboratório, foram selecionadas e testadas três amostras sorológicas com sabida reatividade para o padrão “anéis e bastões” em cinco *kits* comerciais (VIROIMMUN®, EUROIMUMM®, BION®, WAMA® e INOVA®) de FAN HEP-2. Essas amostras estavam armazenadas no referido laboratório sem qualquer identificação dos pacientes e seriam posteriormente descartadas.

Análises

Todas as análises foram realizadas no Setor de Soroimunologia e Hormônios do Laboratório São José, em Barbacena. Foram utilizados cinco diferentes *kits* comerciais de FAN HEP-2, das seguintes marcas: VIROIMMUN®, EUROIMUMM®, BION®, WAMA® e INOVA®. As leituras da fluorescência foram realizadas em um microscópio de fluorescência da marca Olympus, modelo BX 60, em aumento de 100x e 400x, por dois observadores com no mínimo cinco anos de experiência.

As amostras foram classificadas como reagentes ou não reagentes de acordo com o resultado da positividade ou negatividade para o padrão “anéis e bastões” nos diferentes *kits* comerciais. O valor da titulação, diluição, foi de 1:80.

Aspectos de éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética, sob o número do parecer 909.006.

Análise estatística

A análise do grau de concordância entre os resultados das amostras foi realizada pelo teste Kappa, com

cálculo do valor de *p*. Considerou-se como grau de concordância “fraco” índice de Kappa inferior a 0,4; grau de concordância “moderado” com Kappa entre 0,4 e 0,7; e o grau “forte” considerado com Kappa superior a 0,7.

DISCUSSÃO

Entre os resultados dos testes EUROIMUMM® e INOVA® (primeiro grupo), houve concordância de 100%, sendo, portanto, o índice Kappa igual a 1. Comparando os resultados dos testes VIROIMMUN®, BION® e WAMA® (segundo grupo), também houve concordância de 100%, sendo, portanto, o índice Kappa igual a 1. Por outro lado, comparando qualquer dos testes do primeiro grupo com qualquer dos testes do segundo grupo, o resultado do teste de concordância foi zero. Portanto, em relação à intensidade de concordância, os kits concordam e discordam totalmente (Tabela 1).

A padronização do teste de FAN HEP-2 é objeto de estudo há alguns anos, como demonstrado na literatura.^{10,11} Para que os resultados liberados pelos laboratórios sejam precisos e reprodutíveis, a uniformidade dos kits se faz necessária, otimizando a interpretação adequada desses resultados pelo médico e fazendo com que o paciente não seja investigado de maneira desnecessária, no caso de resultados não reagentes ou mesmo reagente, mas com padrões de imunofluorescência pouco associados a doenças autoimunes, aumentando ainda mais os custos pela realização de novos testes.¹⁰⁻¹²

O 3º Consenso Brasileiro para Pesquisa de Autoanticorpos em células HEP-2 relata a necessidade de os laboratórios realizarem a titulação dos conjugados fluorescentes utilizados na realização do teste, em virtude da heterogeneidade dos equipamentos utilizados para a leitura dos testes nos laboratórios. Mostrou-se que existe grande variabilidade entre os conjugados dos kits comerciais, apesar de já existirem critérios bem-definidos na literatura em relação às especificações analíticas dos conjugados. É importante ressaltar ainda que, além da verificação da titulação do conju-

gado, é necessária a checagem rotineira das objetivas e dos filtros e da lâmpada do microscópio, que interferem na definição do título do conjugado e checagem do tempo de lâmpada e se a mesma está centrada.^{10,11}

Nosso estudo demonstrou que os resultados de soros reagentes para o padrão “anéis e bastões” obtidos em um determinado kit de FAN HEP-2 não são reprodutíveis em outros diferentes kits comerciais, sendo que 60% dos substratos analisados HEP-2 não expressaram os antígenos para ligação dos anticorpos e visualização do referido padrão de IFI. Esse padrão é mais comumente visto em pacientes portadores de hepatite C, especialmente nos que realizam tratamento com combinação das drogas ribavirina + interferon.^{13,14} Pesquisas recentes demonstram que o padrão anéis e bastões não esteve relacionado ao genótipo do vírus, à carga viral ou às características demográficas dos pacientes, acreditando-se estar relacionado ao tratamento sem interferência na resposta do paciente, sendo que a ribavirina induz a apresentação do padrão nas células em cultura.¹⁵ Pesquisas recentes revelaram como antígenos-alvo as enzimas inibidas pela ribavirina, citidina-trifosfato sintase (CTPS) e inosina-5'-monofosfato desidrogenase 2 (IMPDH2). Averiguou-se que IMPDH2 é de fato o principal alvo dos anticorpos antianéis e bastões, enquanto CTPS é um alvo improvável.^{16,17} Os mecanismos responsáveis pela produção desses anticorpos em portadores crônicos de hepatite C permanecem obscuros, todavia, é possível que esses autoanticorpos estejam associados à falta de resposta ao tratamento e mais chance de recidiva.^{18,19}

Nossos resultados reforçam a necessidade de que, durante a elaboração do laudo por parte do laboratório, o médico solicitante seja informado de que o reconhecimento desse padrão é substrato-dependente, evitando a realização de repetições e testes desnecessários para esclarecimento do quadro. Do lado do médico solicitante, torna-se fundamental que este, necessitando confirmar a positividade para esse anticorpo, informe ao laboratório, para que a reação seja realizada em substratos que sabidamente possuem os antígenos-alvo que possibilitem a detecção.⁹⁻¹¹

Tabela 1 - Reatividade de amostras sorológicas em kits comerciais FAN HEP-2

Amostras	Euroimm®	Inova®	Viroimmun®	Bion®	Wama®
1	Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
2	Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente
3	Reagente	Reagente	Não Reagente	Não Reagente	Não Reagente

Fonte: adaptado de Abbas et al.²

CONCLUSÃO

De acordo com os diferentes resultados obtidos no experimento, não houve homogeneidade entre os *kits* comerciais FAN HEP-2 para amostras sabidamente positivas para o padrão “anéis e bastões”. Contudo, os resultados encontrados podem apenas ser aplicados aos *kits* referidos no experimento, não podendo estimar a concordância em relação às diversas outras marcas existentes no mercado.

REFERÊNCIAS

- Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Análise crítica do teste de anticorpos antinúcleo (FAN) na prática clínica. *Rev Bras Reumatol.* 2007; 47(4): 265-75.
- Dellavance A, Leser PG, Andrade LEC. Importância do padrão de fluorescência na interpretação do teste do FAN: o caso do padrão pontilhado fino denso. *Rev Assoc Med Bras.* 2007; 53(5): 439-45.
- Wolf L, Sheahan M, McCormick J. Classification criteria for systemic lupus erythematosus: frequency in normal patients. *JAMA.* 1976; 236(13): 1497-9.
- Andrade LEC. O fator antinúcleo para além do bem e do mal. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45(3): 185-99.
- Dellavance A, Andrade LEC. Como interpretar e valorizar adequadamente o teste de anticorpos antinúcleo. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(3): 157-68.
- Miyakis S, Karamanof G, Lontos M, Moutokalakis TD. Factors contributing to inappropriate ordering of tests in an academic medical department and the effect of an educational feedback strategy. *Postgrad Med J.* 2006; 82(974): 823-9.
- Tan EM. Autoantibodies and autoimmunity: a three-decade perspective. *New York Acad Sciences.* 1997; 815:1-14.
- Francescantonio PLC, Cruvinel WM, Dellavance A, Andrade LEC, Taliberti BH, von Mühlen CA, *et al.* IV Consenso Nacional Brasileiro para pesquisa de auto anticorpos em células HEP-2. *Rev Bras Reumatol.* 2014; 54(1): 44-50.
- Dellavance A, Gabriel Júnior A, Cintra AFU, Ximenes AC, Nuccitelli B, Taliberti BH, *et al.* II Consenso Nacional para a padronização dos laudos de FAN em células HEP-2. *Rev Bras Reumatol.* 2003; 43(3): 129-40.
- Von Mühlen CA, Nakamura R. Guidelines for selecting and using laboratory tests for autoantibodies to nuclear, nucleolar and other related cytoplasmic antigens. In: Nakamura RM, Keren DF, Bylund DJ. *Clinical and laboratory evaluation of human autoimmune.* Chicago: ASCP Press; 2002. p.450.
- Francescantonio PLC, Andrade LEC, Cruvinel WM, Araújo FI, Dellavance A, Gabriel Júnior A. III Consenso nacional para padronização dos laudos de FAN em células HEP-2. *J Bras Patol Med Lab.* 2009; 45(3): 185-99.
- Leser PG, Dellavance A, Barbosa SH. Distinctive features of antinuclear antibodies observed in health and in subjects with autoimmune rheumatic diseases. In: Conrad K. *Animal models to human genetics: research on the induction and pathogenicity of autoantibodies.* Dresden: Pabst Science Publishers; 2004. p.493-510.
- Carcamo WC, Ceribelli A, Calise SJ, Krueger C, Liu C, Daves M, *et al.* Differential reactivity to IMPDH2 by anti-rods/rings autoantibodies and unresponsiveness to pegylated interferon-alpha/ribavirin therapy in US and Italian HCV patients. *J Clin Immunol.* 2013; 33(2): 420-6.
- Bortolotti F, Vajro P, Balli F, Giacchino R, Crivellaro C, Barbera C, *et al.* Non-organ specific autoantibodies in children with chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 1996; 25(5): 614-20.
- Keppeke GD. Caracterização de autoanticorpos associados ao padrão de Imunofluorescência “Rods and Rings” em pacientes infectados com vírus da hepatite C [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2011.
- Abuaf N, Lunel F, Giral P, Borotto E, Laperche S, Poupon R, *et al.* Non-organ specific autoantibodies associated with chronic C virus hepatitis. *J Hepatol.* 1993; 18(3): 359-36.
- Gregorio GV, Choudhuri K, Ma Y, Pensati P, Iorio R, Grant P, Garson J, *et al.* Mimicry between the hepatitis C virus polyprotein and antigenic targets of nuclear and smooth muscle antibodies in chronic hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol.* 2003; 133(3): 404-13.
- Wen L, Ma Y, Bogdanos DP, Wong FS, Demaine A, Mieli-Vergani G, *et al.* Pediatric autoimmune liver diseases: the molecular basis of humoral and cellular immunity. *Curr Mol Med.* 2001; 1: 379-89.
- Radzinski C, Probst C, Teegen B, Liaskos C, Koutsoumpas AL, Smyk DS, *et al.* Development of a recombinant cell-based indirect immunofluorescence assay for the determination of autoantibodies against soluble liver antigen in autoimmune hepatitis. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013: 572815.