



# VI CONGRESO LATINOAMERICANO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA

## II CONGRESO INTERNACIONAL DEL COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

*¡El riesgo es que te quieras quedar!*

Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024

**NOVEDADES DEL ICAP PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES REUMATOLÓGICAS ASOCIADAS A ANA/AC.**



# NOVEDADES DEL ICAP PARA LA CARACTERIZACIÓN DE ENFERMEDADES AUTOINMUNES REUMATOLÓGICAS ASOCIADAS A ANA/AC.

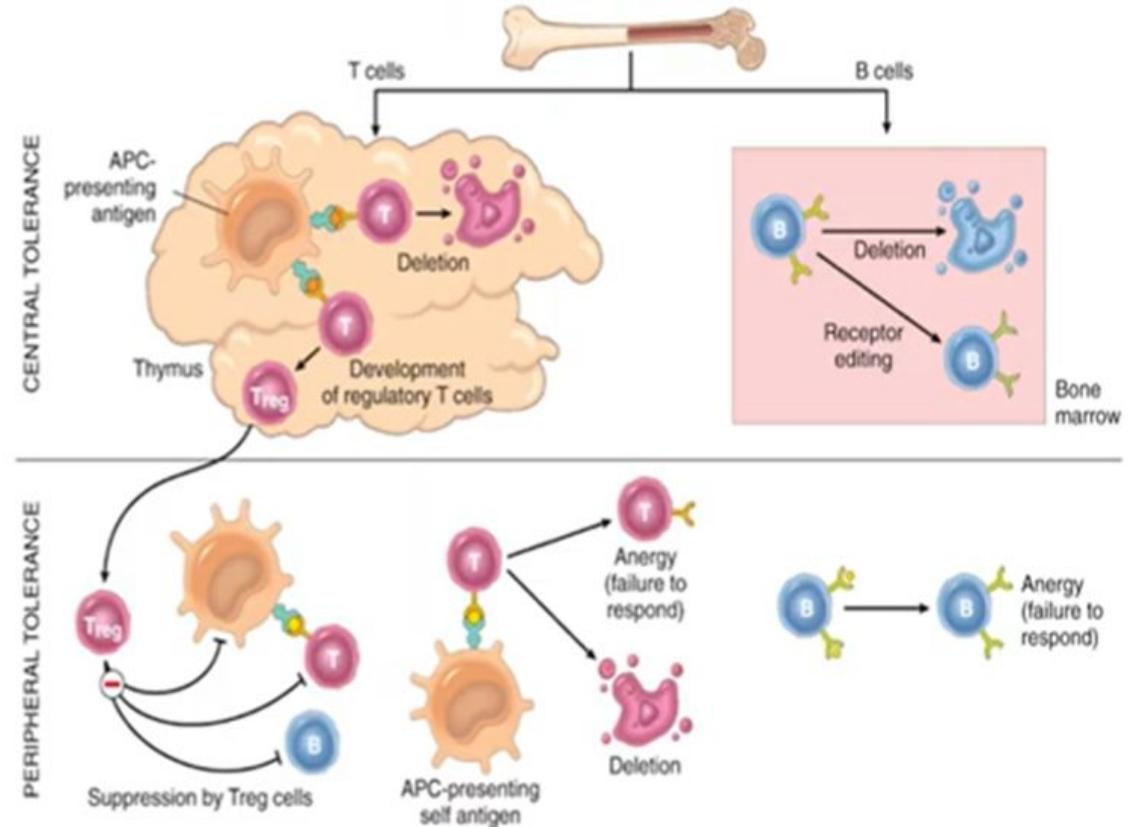
Andrés Mauricio Durango Quintero  
Bacteriólogo y laboratorista clínico  
Master en enfermedades autoinmunes  
Autoimmunity producto specialist



# Tolerancia inmunitaria

**Tipos:** Central y periférica.

- **Tolerancia:** Estado de falta de respuesta frente a un antígeno que se induce mediante la exposición de linfocitos específicos a este antígeno.
- **Autotolerancia:** Falta de reactividad inmunitaria a los antígenos tisulares propios.



Kumar, V. Abbas, A. Aster, J (2018), p.146

[www.congresocolabiocli.com](http://www.congresocolabiocli.com)

# Tolerancia inmunitaria

**Perdida de la autotolerancia:** Efectos combinados de los genes predisponentes, que influyen en la tolerancia del linfocitos y los factores ambientales (infecciones, lesión tisular).

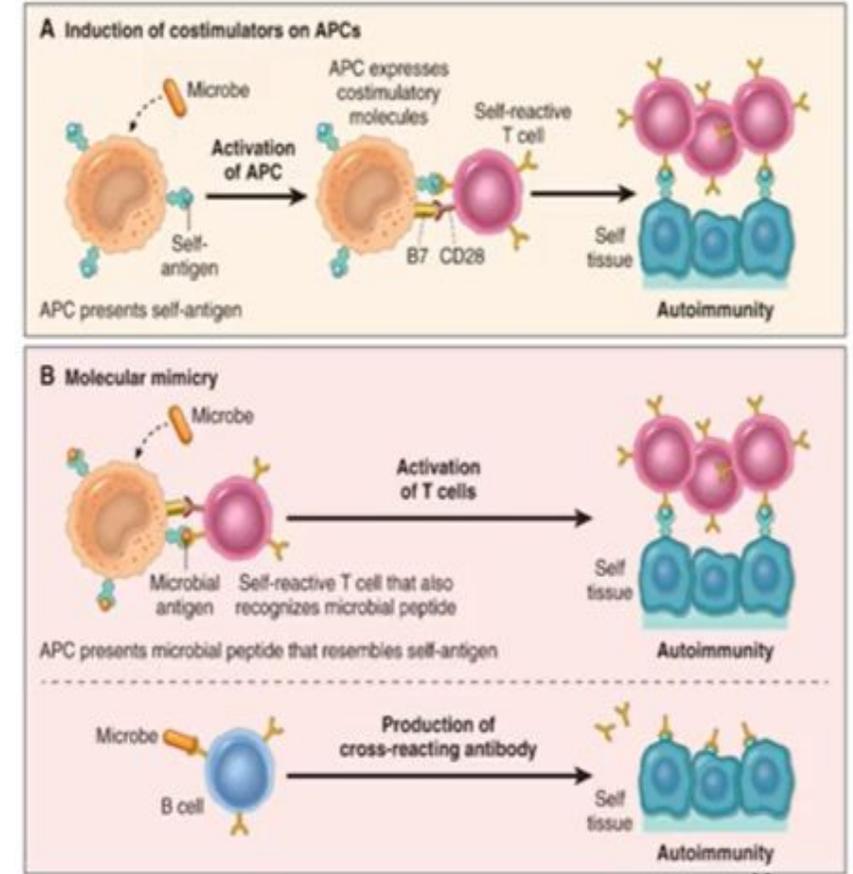
## Genéticos:

Trastornos multigénicos.

- Pueden discurrir en familias.
- Enfermedades ligadas al HLA de clase II. Mayor riesgo relativo de presentar la enfermedad.

## Ambientales:

- Sexo.
- **Necrosis tisular:** expresión de moléculas coestimuladoras para CPA.
- Reactividad cruzada por mimetismo molecular.
- Daño por radiación UV (LES).
- Tabaco (AR).
- Propagación de epítomos.

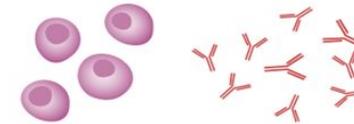


# Patogenia de la autoinmunidad

Falla en la discriminación

Reconocimiento como extraña de una molécula que en realidad es propia

Desencadenamiento de una respuesta inmunológica con producción de autoanticuerpos



Autoinmunidad específica

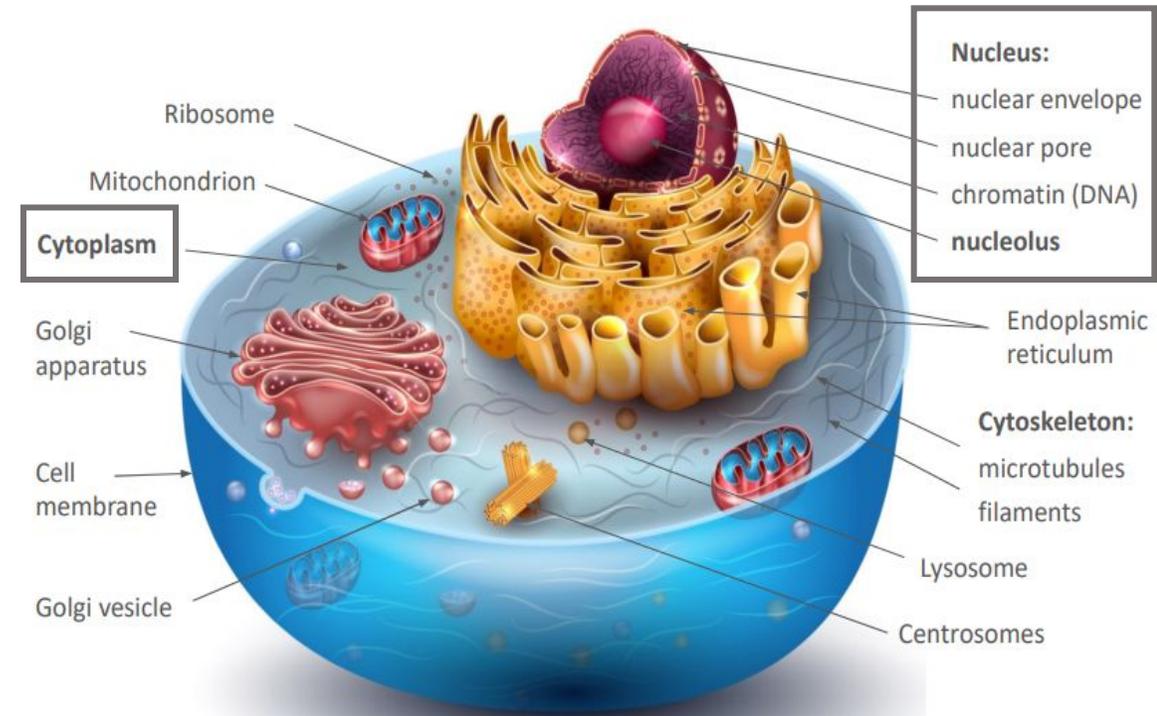
Autoinmunidad sistémica



# Anticuerpos antinucleares (ANA)/anticuerpos anticeulares (AC).

## ANA/AC HEP-2 IFA.

- El ensayo HEP-2 IIF es el **gold standard** para el cribado de ANA.
- La célula HEp-2 contiene > 150 antígenos diferentes
- HEp-2 IIF permite la identificación de numerosos autoanticuerpos.
- Alta sensibilidad: una prueba negativa prácticamente descarta el LES.
- Los resultados positivos se informan como un título y un patrón.

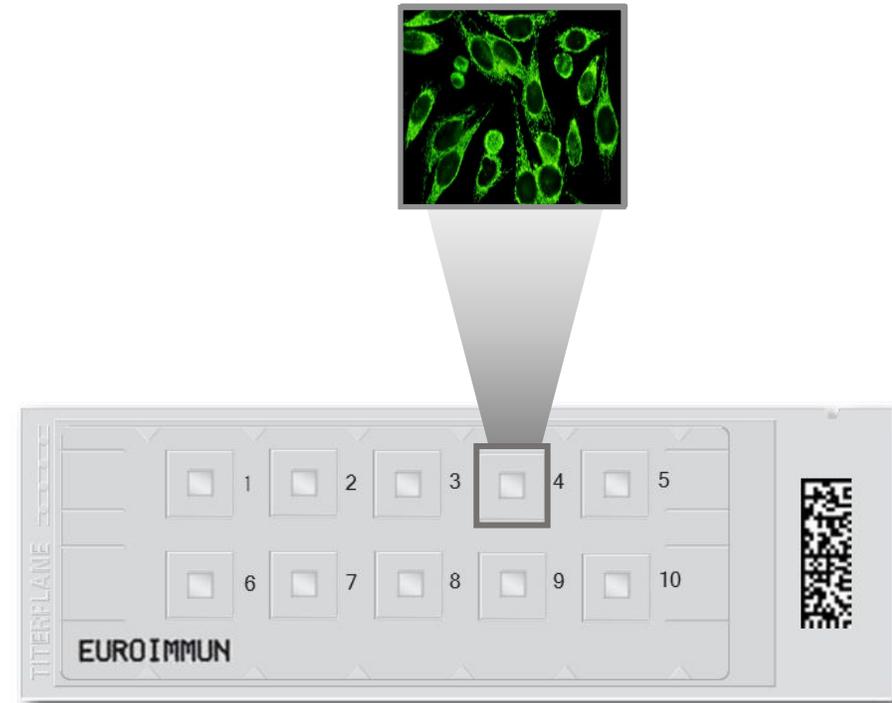
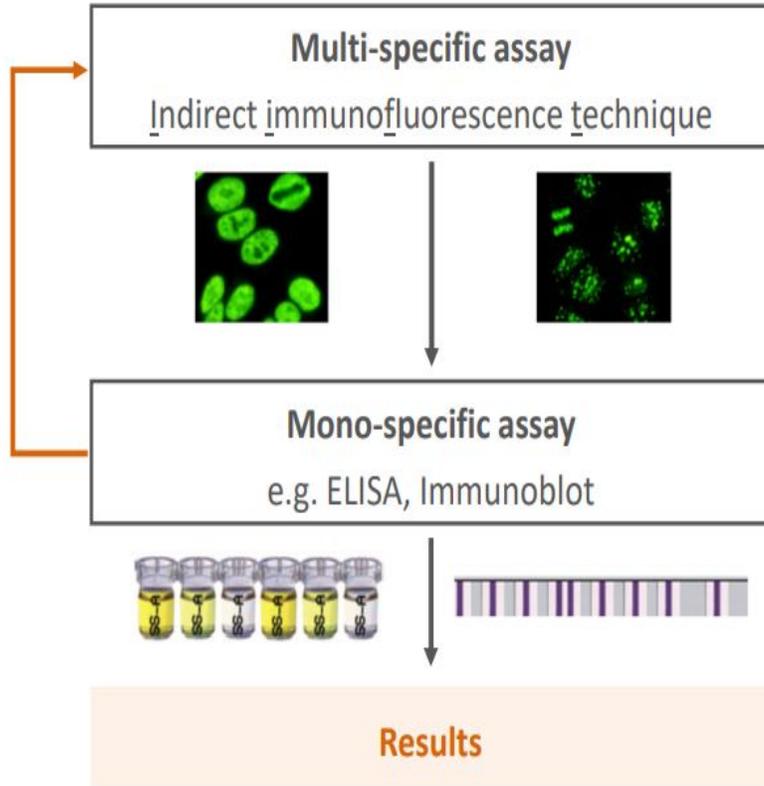


# Anticuerpos antinucleares (ANA)/ anticuerpos anticeelulares (AC).

## 1. Screening with IIFT

- Gold standard for ANA screening
- Complete antigen spectrum
- Easy to perform
- Automatable

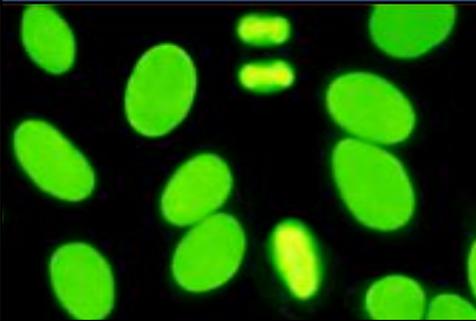
## 2. Confirmation & differentiation



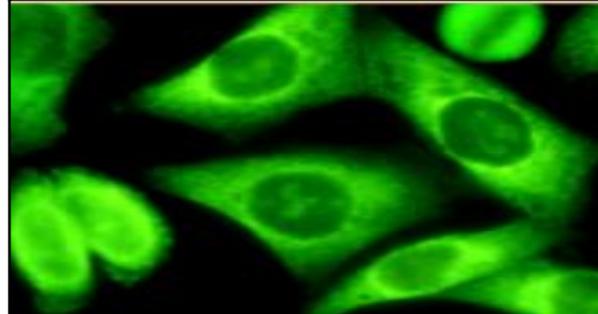
# Anticuerpos antinucleares (ANA)/ anticuerpos anticeelulares (AC).

**ANA HEP-2 CÉLULAS HEP-2**

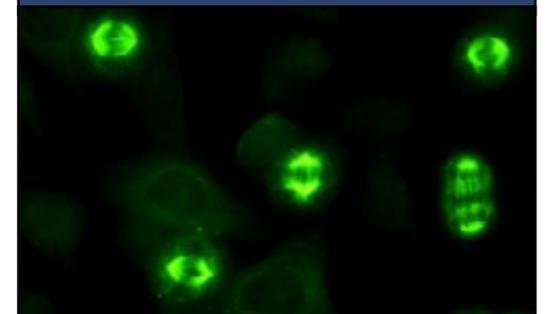
**Nucleares**



**Citoplasmáticos**



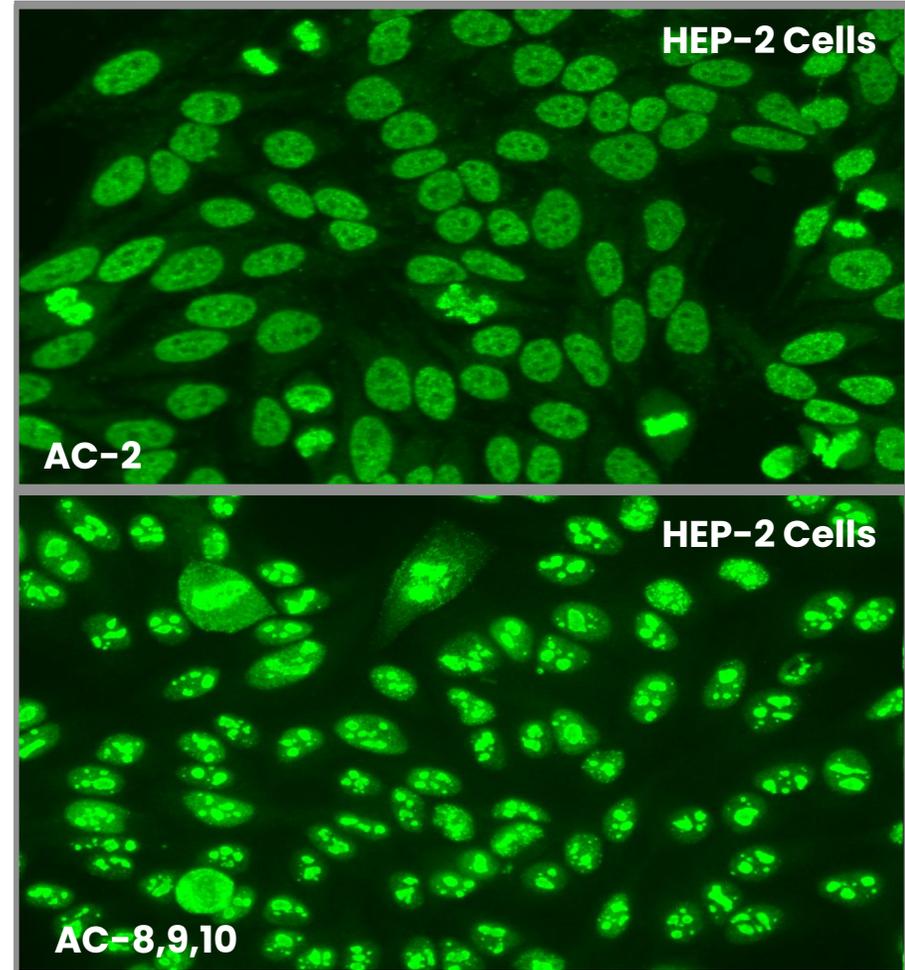
**Mitóticos**



## ¿Porqué ANA/AC HEP-2 IFA?

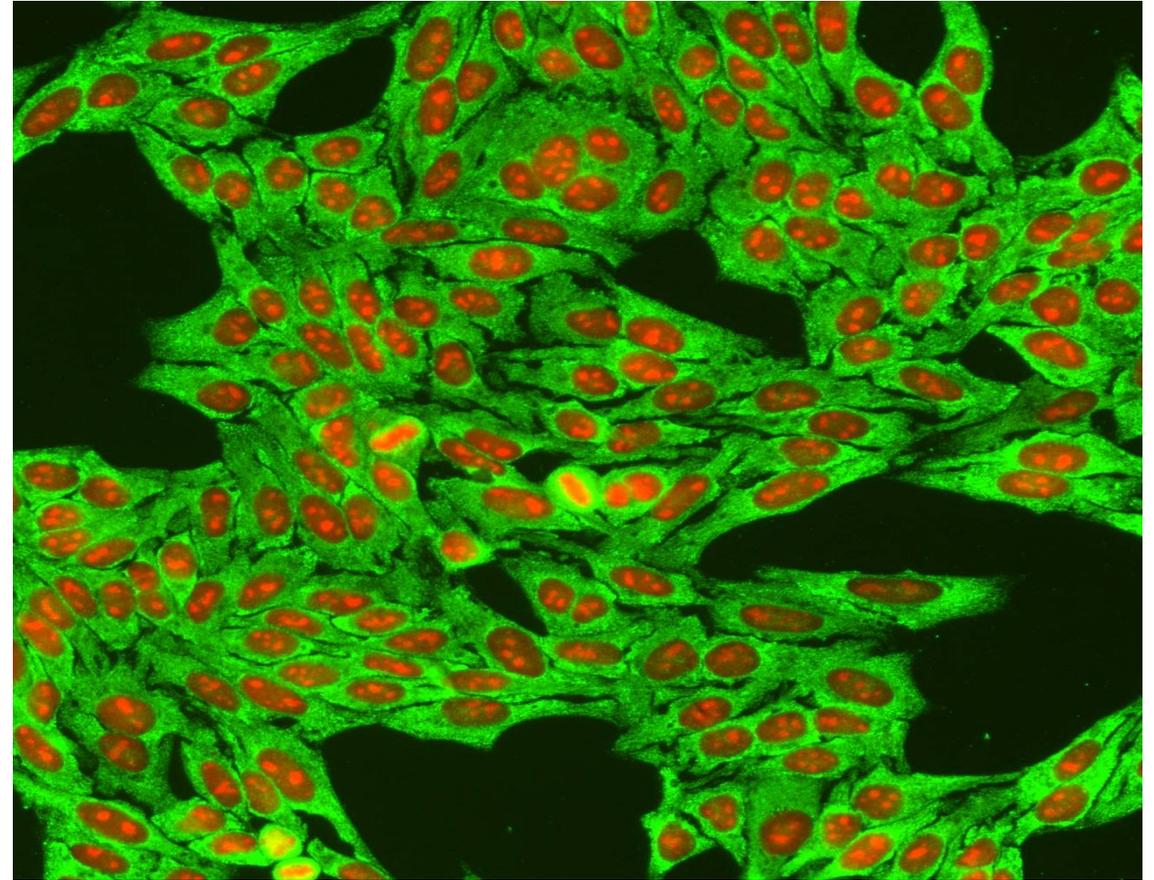
### ELISA y CLIA:

- Contienen un número limitado de antígenos especificados por el fabricante.
- Suelen tener una mezcla de antígenos recombinantes y nativos.
- **Ejemplo:** algunas pruebas de detección de ANA screening líder solo incluye 11 antígenos. Esto significa que muchos anticuerpos clínicamente relevantes que son fácilmente detectados por HEP-2 IFA se pasan por alto. Estos anticuerpos incluyen:
  - Anticuerpos contra antígenos nucleolares asociados; crítico en la identificación de pacientes con SSc.
  - Anticuerpos contra **DFS70**; un antígeno importante para descartar una **EARS**.



## Patrón de fluorescencia

- El patrón de fluorescencia es la manifestación visual de una reacción inmunológica entre el antígeno del sustrato y el autoanticuerpo del paciente, estos son repetitivos ya que están asociados a antígenos específicos, siempre que estos sean marcados por el autoanticuerpo del paciente el conjugado evidenciará la reacción a través del mismo patrón.
- La gran mayoría de patrones están asociados a antígenos específicos que son parte de los algoritmos de diagnóstico de enfermedades autoinmunes.



# Consenso internacional de patrones ANA (ICAP)



[www.ANApatterns.org](http://www.ANApatterns.org)

## ¿Por qué necesitamos el ICAP?

- Los ANA son importantes biomarcadores de ERAS.
- Está incluido en los criterios de clasificación ACR/EULAR SLE 2019. Al menos un IIF de ANA de  $\geq 1:80$  es el criterio de entrada.
- Distintos patrones ayudan en el diagnóstico diferencial.
- Alta sensibilidad.
- Sensibilidad del 95 % y especificidad del 57 % para el LES.
- Desde su lanzamiento en 2014, ICAP ha logrado avances internacionales progresivos, aceptación y cumplimiento documentados por parámetros estadísticos.





# HEP-2 CIC PROJET

## Objetivos.

- Caracterización de nuevos patrones ANA.
- Determinar especificidad antigénica y enfermedades asociadas.



## HEp-2 CIC PROJECT

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF HEP-2 PATTERNS  
FREQUENCY OF NUCLEAR PATTERNS IN HEP-2 IFA DIFFER IN LABORATORIES  
WORLDWIDE



Trischna Martins<sup>1</sup>, Luis Eduardo Coelho Andrade<sup>1</sup>, HEP-2 CIC Project ([www.anapatterns.org](http://www.anapatterns.org))<sup>2\*</sup>

### Affiliations:

<sup>1</sup>Rheumatology Division, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, SP 04023-062, Brazil

<sup>2</sup>International Consensus on ANA Patterns, Autoantibody Standardizing Committee (ICAP), International Union of Immunological Societies

\*Complete list of participants at the HEP-2 CIC project section in the ICAP website



[www.congresocolabiocli.com](http://www.congresocolabiocli.com)



### Sample ANA HEp-2 IIFA Report

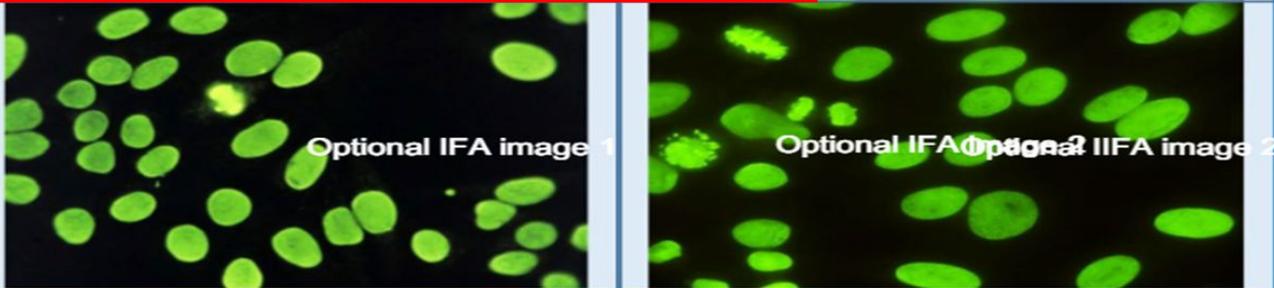
**Institution.** e.g. Hospital for Autoimmune Diseases  
**Department.** e.g. Immunology Laboratory, room 333, ext. # 2355  
**Referral from:** e.g. Rheumatic Diseases Clinic, Dr. Olive Doe, phone 345-3567

**Date:** March 6, 2019 (date of ANA report)

**Patient Name:** Jane Doe, PIN #12345  
**Born:** May 13, 2008

**Antinuclear Antibody Test (Anti-Cell Antibodies Test)**  
 Indirect Immunofluorescence Assay on HEp-2 cells - serum  
**Screening titer:** 1:80

**Result:** Nuclear homogeneous AC-1 1:1,280  
 Reference range: ≤ 1:160  
 Images (from actual patient)



**Remarks:** AC-1 is a pattern associated with autoantibodies to dsDNA and nucleosomes. When clinically indicated, we strongly suggest testing for such specificities. Relevant information, including clinical associations, may be found at [www.anapatterns.org](http://www.anapatterns.org).

# Iniciativa de reporte del ICAP

Immunologic Research (2021) 69:594–608  
<https://doi.org/10.1007/s12026-021-09233-0>

ORIGINAL ARTICLE



## How to report the antinuclear antibodies (anti-cell antibodies) test on HEp-2 cells: guidelines from the ICAP initiative

Carlos Alberto von Mühlen<sup>1,2</sup> · Ignacio Garcia-De La Torre<sup>3</sup> · Maria Infantino<sup>4</sup> · Jan Damoiseaux<sup>5</sup> · Luis E. C. Andrade<sup>6,7</sup> · Orlando Gabriel Carballo<sup>8,9</sup> · Karsten Conrad<sup>10</sup> · Paulo Luiz Carvalho Francescantonio<sup>11</sup> · Marvin J. Fritzler<sup>12</sup> · Manfred Herold<sup>13</sup> · Werner Klotz<sup>13</sup> · Wilson de Melo Cruvinel<sup>11</sup> · Tsuneyo Mimori<sup>14</sup> · Minoru Satoh<sup>15</sup> · Lucile Musset<sup>16</sup> · Edward K. L. Chan<sup>17</sup>

Received: 24 June 2021 / Accepted: 30 August 2021 / Published online: 9 October 2021  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

- **Resultado cualitativo:**
  - Negativo/positivo.
  - Patrón de fluorescencia.
- **Resultado semicuantitativo:**
  - Título de fluorescencia.



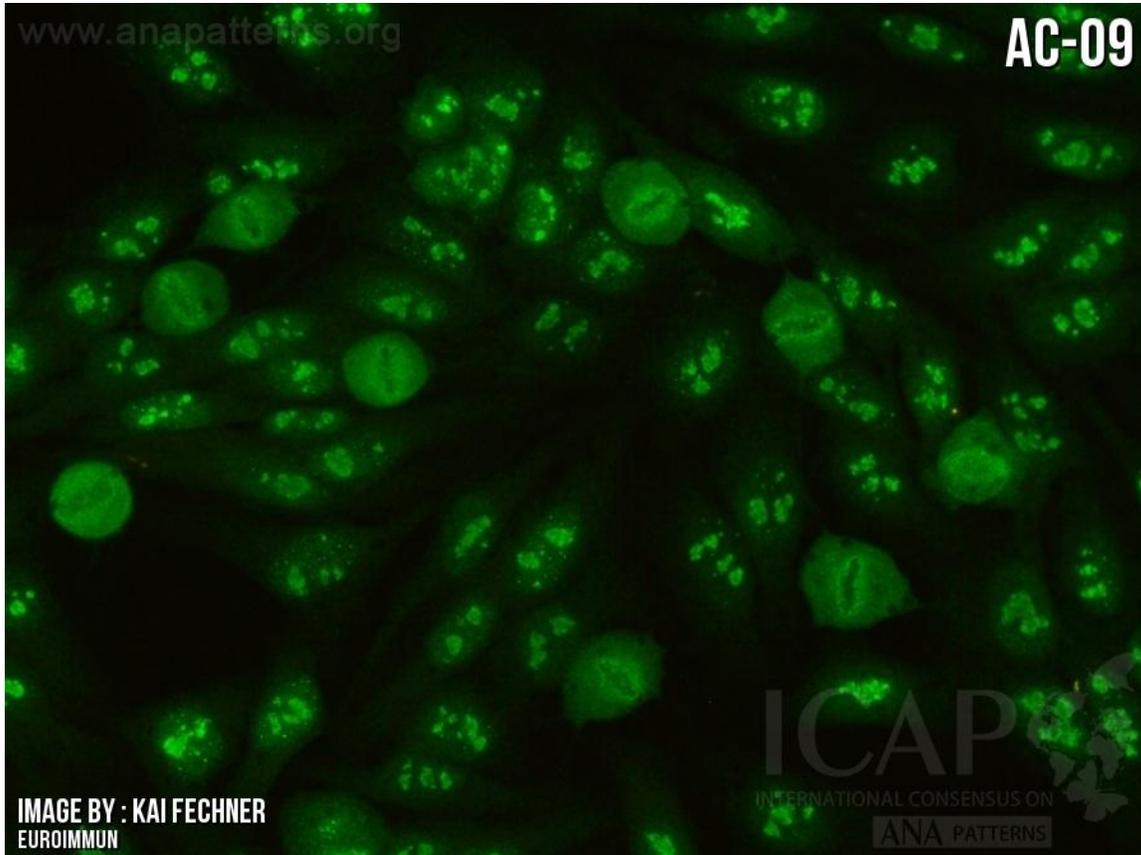
# Importancia del patrón de fluorescencia



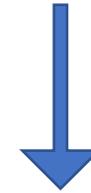
- Comúnmente encontrados en pacientes con SSc cutánea limitada, y como tal son incluidos en los criterios para la clasificación de SSc.
- En combinación con el fenómeno de Raynaud, el patrón AC-3 es predictivo para el inicio de ES cutánea limitada.
- El patrón AC-3 también ha sido observado en un subconjunto de pacientes con PBC; frecuentemente estos pacientes tienen ES simultáneamente con CBP.



# Importancia del patrón de fluorescencia



**ANA HEP-2**



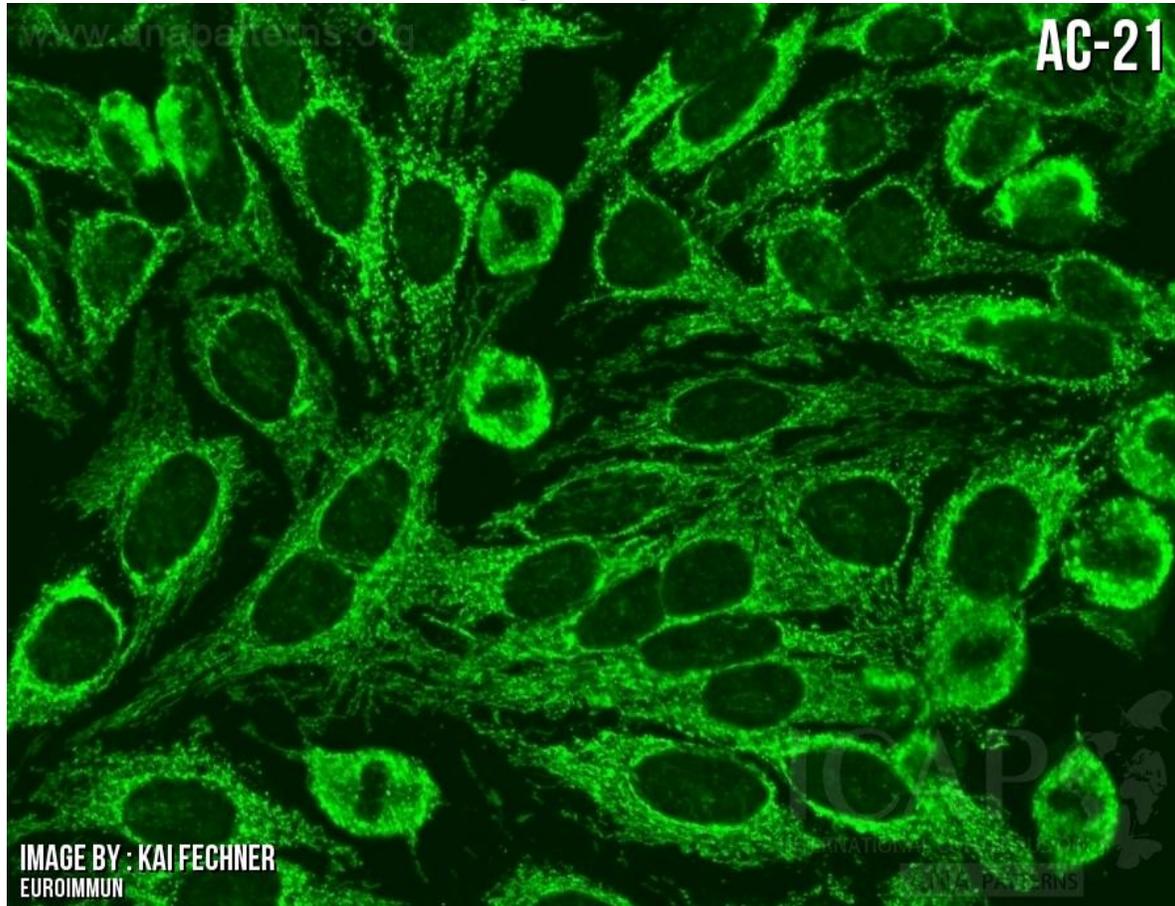
**Positivo, patrón nucleolar grumoso AC-9.**

**Antígenos asociados:** U3snoRNP/fibrilarina.

**Enfermedades asociadas:** ES.



# Importancia del patrón de fluorescencia



- Comúnmente se encuentra en CBP, pero también se ha detectado en ES, incluyendo síndrome de sobreposición CBP-ES y CBP-SSJ.

# Importancia del título de fluorescencia

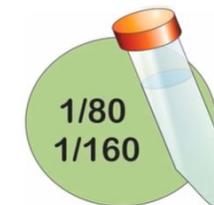
- “Nivel de autoanticuerpos”.
- Títulos mas altos están mejor asociados con las EARS y tienen mayor probabilidad de identificar el autoantígeno.
- 1/80 y 1/160 son los más ampliamente usados.
- ANA de bajo título puede ser significativo.

> [Ann Rheum Dis. 2014 Jan;73\(1\):17-23. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-203863. Epub 2013 Oct 14.](#)

## International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies

Nancy Agmon-Levin <sup>1</sup>, Jan Damoiseaux, Cees Kallenberg, Ulrich Sack, Torsten Witte, Manfred Herold, Xavier Bossuyt, Lucille Musset, Ricard Cervera, Aresio Plaza-Lopez, Carlos Dias, Maria José Sousa, Antonella Radice, Catharina Eriksson, Olof Hultgren, Markku Viander, Munther Khamashta, Stephan Regenass, Luis Eduardo Coelho Andrade, Allan Wiik, Angela Tincani, Johan Rönnelid, Donald B Bloch, Marvin J Fritzler, Edward K L Chan, I Garcia-De La Torre, Konstantin N Konstantinov, Robert Lahita, Merlin Wilson, Olli Vainio, Nicole Fabien, Renato Alberto Sinico, Pierluigi Meroni, Yehuda Shoenfeld

### Serum screening dilution

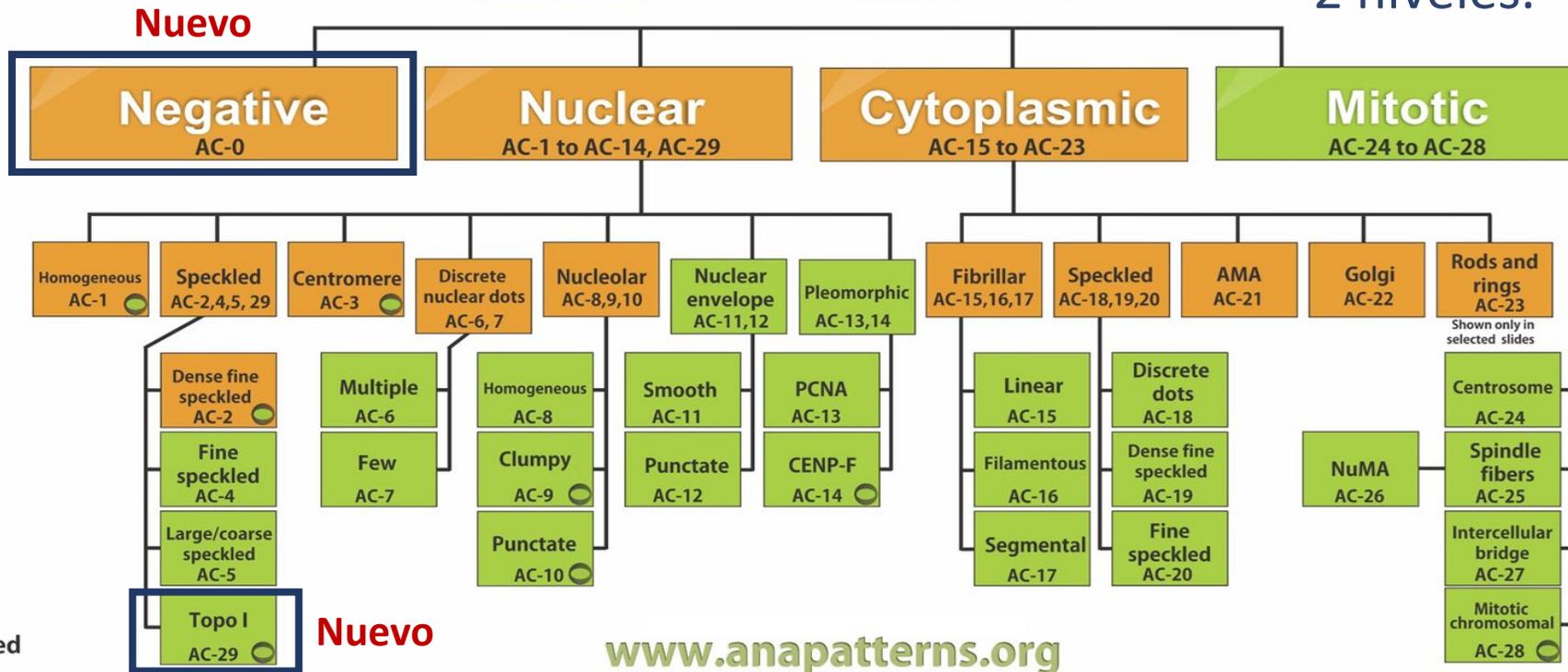


# Recordemos algunas novedades del ICAP (2018).

## ICAP 2018

### HEp-2 cell patterns

- AC-0 + 3 Divisiones.
- 30 patrones AC.
- 2 niveles.

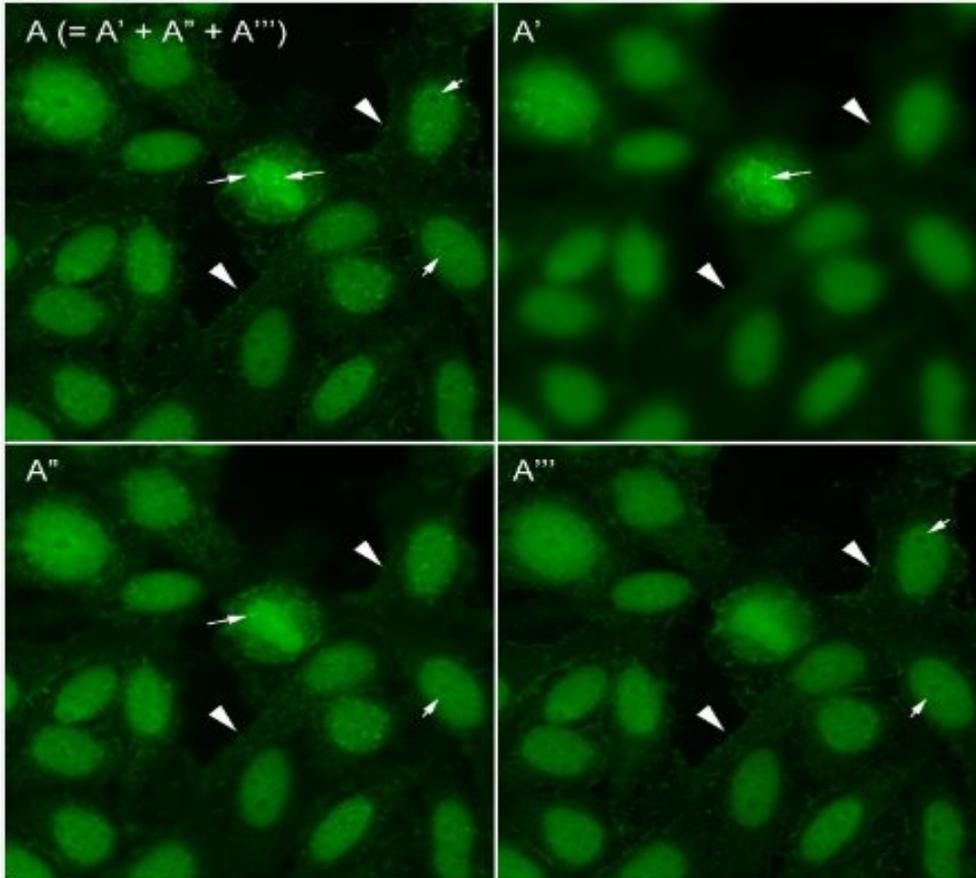


[www.anapatterns.org](http://www.anapatterns.org)

# AC-0 Negativo.



# AC-29 DNA Topoisomerasa I. (Scl-70).

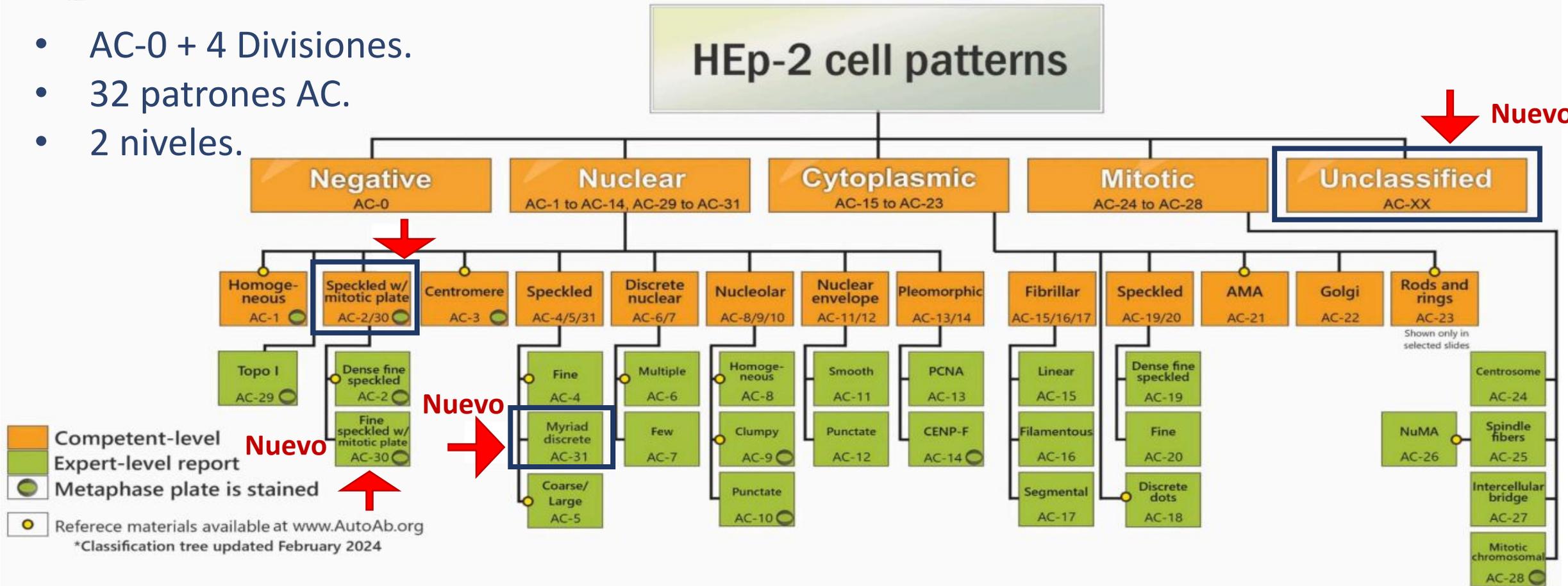


- El patrón AC-29 es muy específico de ES, en particular de la forma cutanea difusa y de las formas mas agresivas de ES.



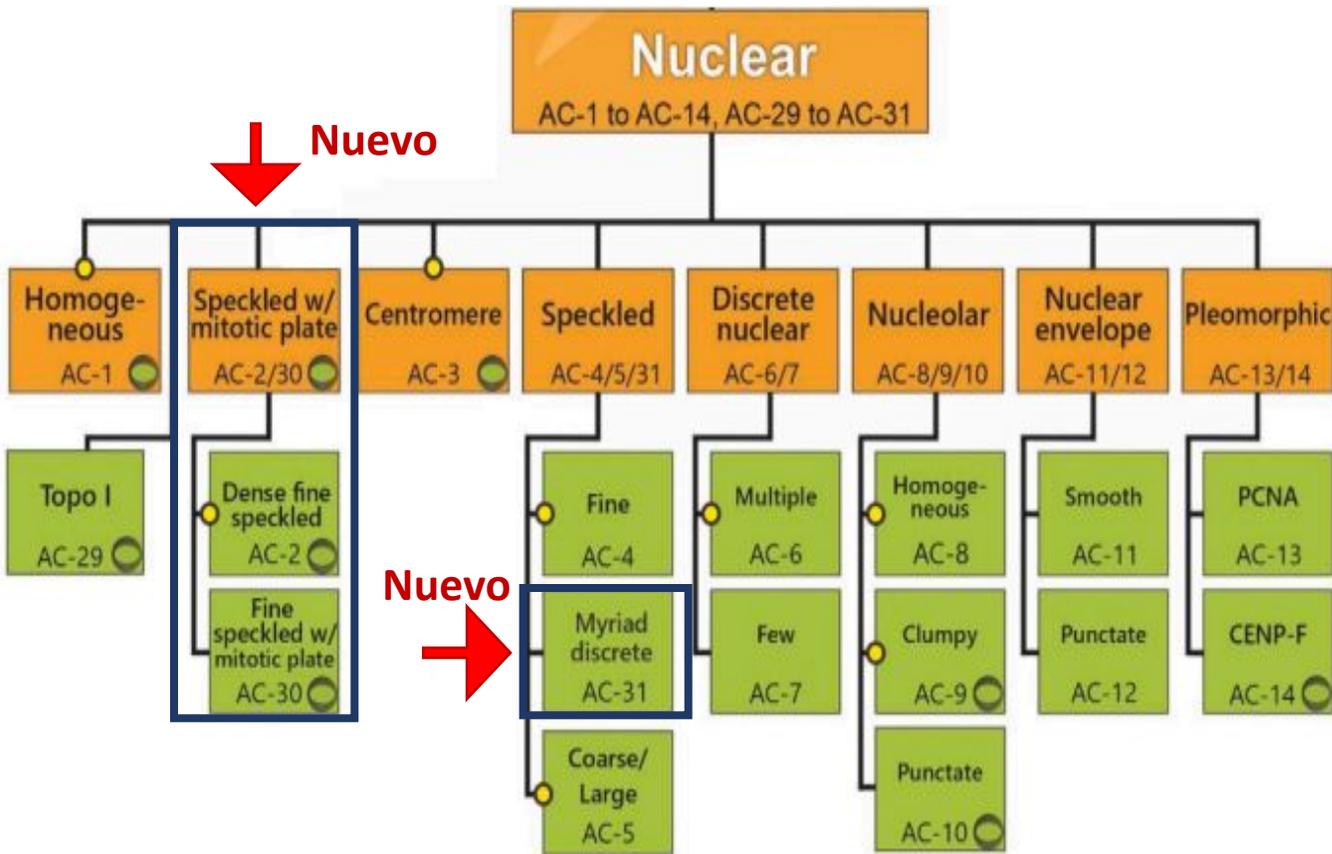
# ICAP: novedades 2024.

- AC-0 + 4 Divisiones.
- 32 patrones AC.
- 2 niveles.

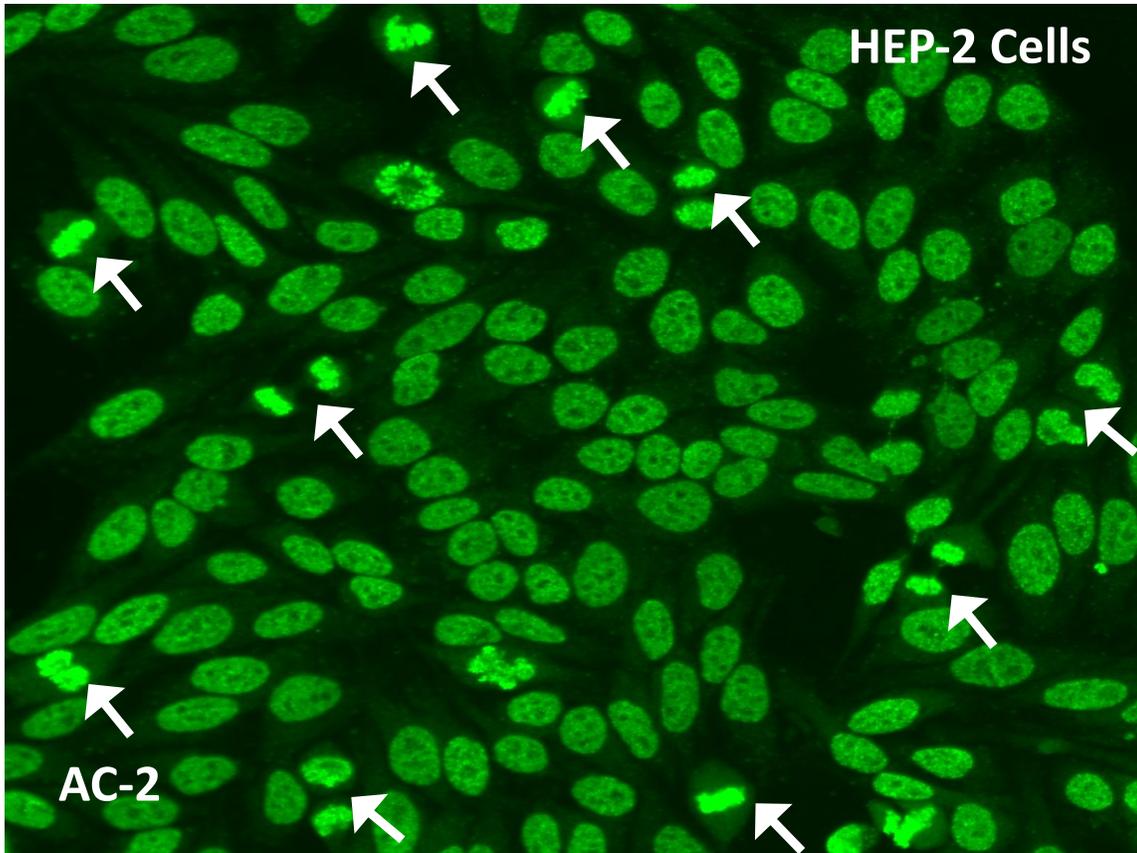


# Implementación de nuevos patrones en el árbol de clasificación, AC-30 y AC-31.

- **AC-30 Nuclear (smooth) fine speckled with stained metaphase plate.**
  - Nuclear granular fino (liso) con placa metafásica teñida.
- **AC-31: Myriad Discrete Speckled Nuclear.**
  - Nuclear granular discreto de múltiples capas.



# Implementación de nuevos patrones en el árbol de clasificación, AC-30 y AC-31.



- **AC-2 Nuclear granular fino denso.**
- **Antígeno asociado:** DFS70 (también conocido como LEDGF/p75).
- Comúnmente encontrado con títulos altos por IFI HEP-2 en individuos aparentemente saludables o en pacientes que no tienen enfermedad reumática autoinmune sistémica (ERAS).
- La asociación negativa con ERAS es válida solamente si la autoreactividad es confirmada como dirigida hacia el antígeno DFS70 (LEDGF/p75) y ningún otro ENA común es reconocido.



# AC-2 Nuclear granular fino denso.

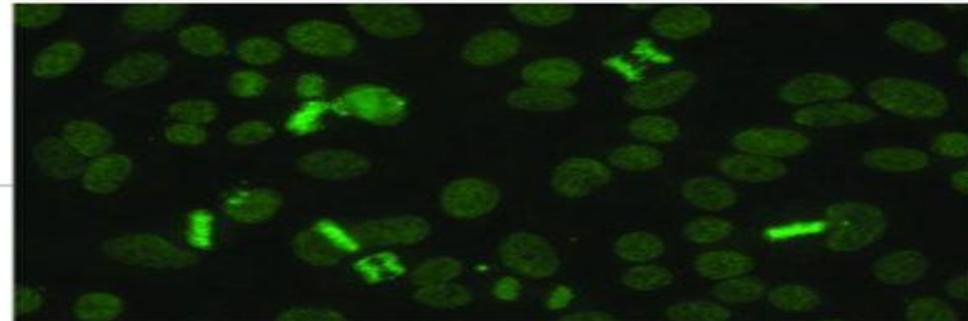
ANA HEp-2

Positive

Negative

Homogeneous  
Coarse speckled  
Centromere  
Nucleolar

Dense fine  
speckled (DFS)  
or other fine  
speckled  
pattern



Test for ANA  
screen (EIA),  
dsDNA, ENA, and  
other antibodies

Testing for DFS70  
and ANA screen  
(ELISA)

Negative  
test results  
**SARD inconclusive<sup>5</sup>**

Positive  
test results  
**SARD very likely**

DFS70 positive  
ANA screen positive  
**SARD inconclusive\***

DFS70 negative  
ANA screen positive  
**SARD likely**

DFS70 negative  
ANA screen negative  
**SARD inconclusive**

DFS70 positive  
ANA screen negative  
**SARD unlikely**

<sup>5</sup> Likelihood depends on 11F pattern obtained

\* According to Mariz et al., it is unlikely that SARD patients have a mono-specific DFS70 antibody. Further studies are needed.

SARD is likely if results can be confirmed (e.g., ENA sub-differentiation). Further studies are needed to determine the likelihood.

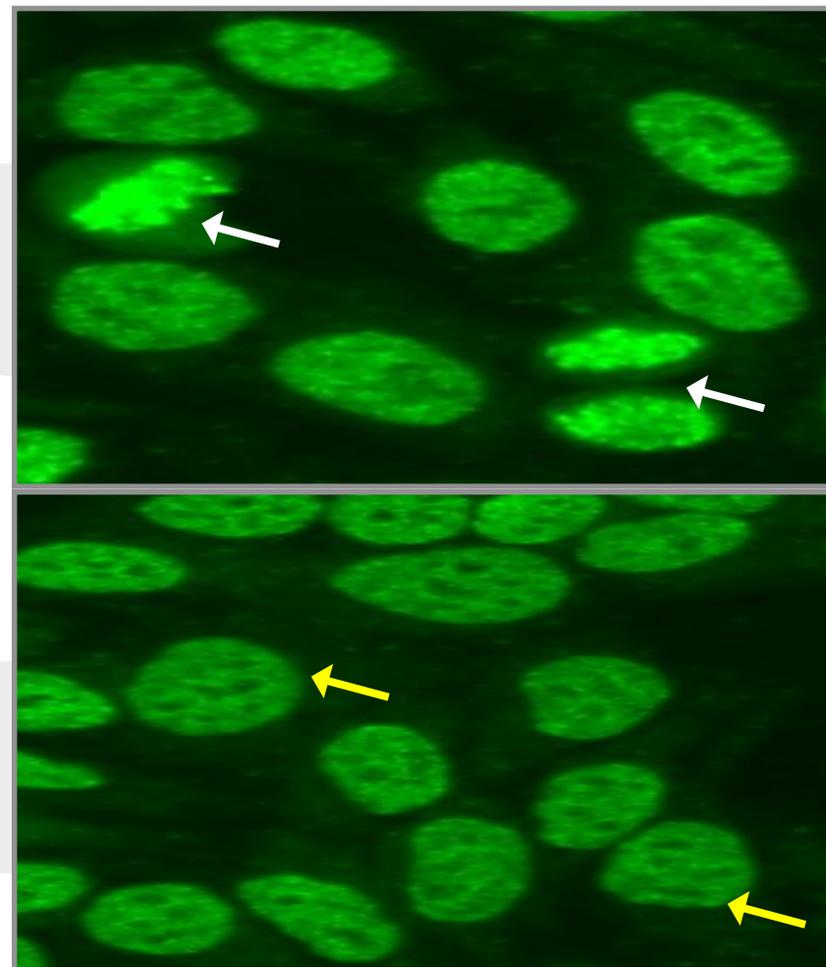
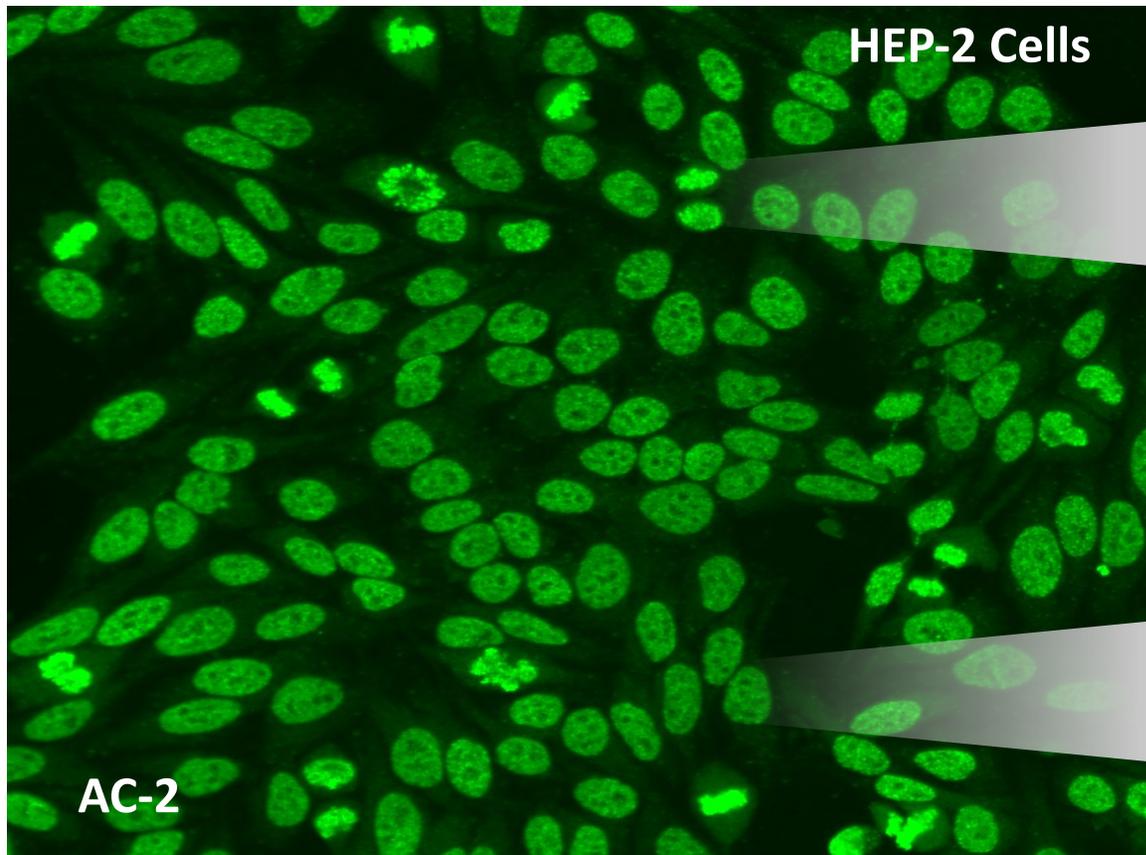
Testing

SARD likely

SARD unlikely

SARD inconclusive

# Implementación de nuevos patrones en el árbol de clasificación, AC-30 y AC-31.



# AC-2 herramientas para diferenciar de otros patrones: Sistemas de inteligencia artificial

Home screen > Search > IFA result page

**Dilutions**

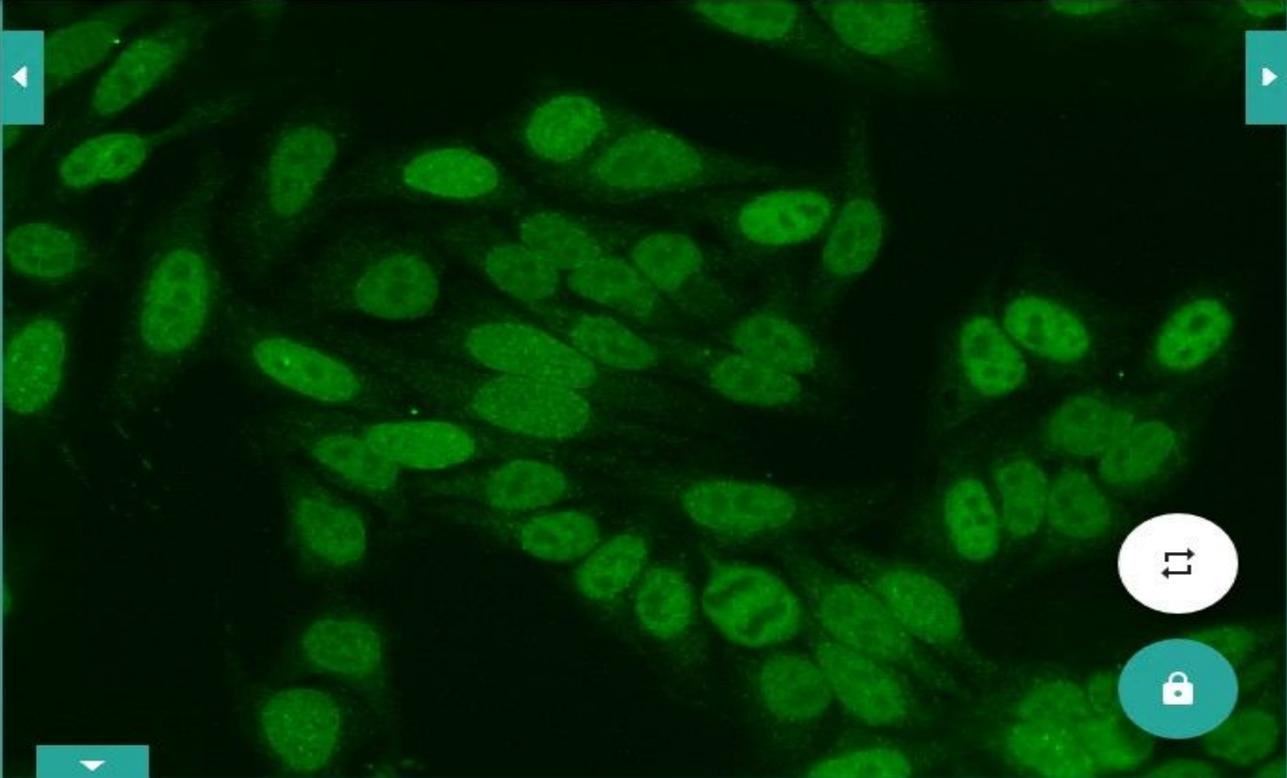
1:80 IgG    1:640 IgG

**Substrates**

HEp-2 (HEp-2, H...)

**Actions**

**Slide preview**



Not evaluable

**Classifier**

- AC-0 No reactivo ?
- AC-1 Homogeneo ?
- AC-2 Nuclear Granular Fino De... ?
- AC-3 Centromero ?
- AC-4 Nuclear Granular Fino** 1:5120 ✓
- AC-5 Nuclear Granular Grueso ?
- AC-6 Granulos Nucleares Mu...** :10240 ✓
- AC-7 Granulos Nucleares Esca... ?
- Ac-8 Nucleolar Homogeneo ?

**Navigation**

1124100966

0 unverified patients / controls

Ignore user assignments

Unknown

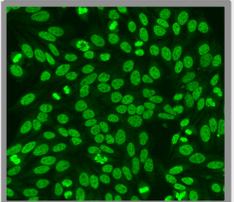
11/28/2023

? ANA

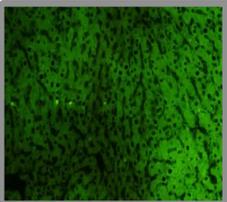
# AC-2 Nuclear granular fino denso, herramientas para diferenciar de AC-1.



HEP-2 Cells



Hígado (primate)



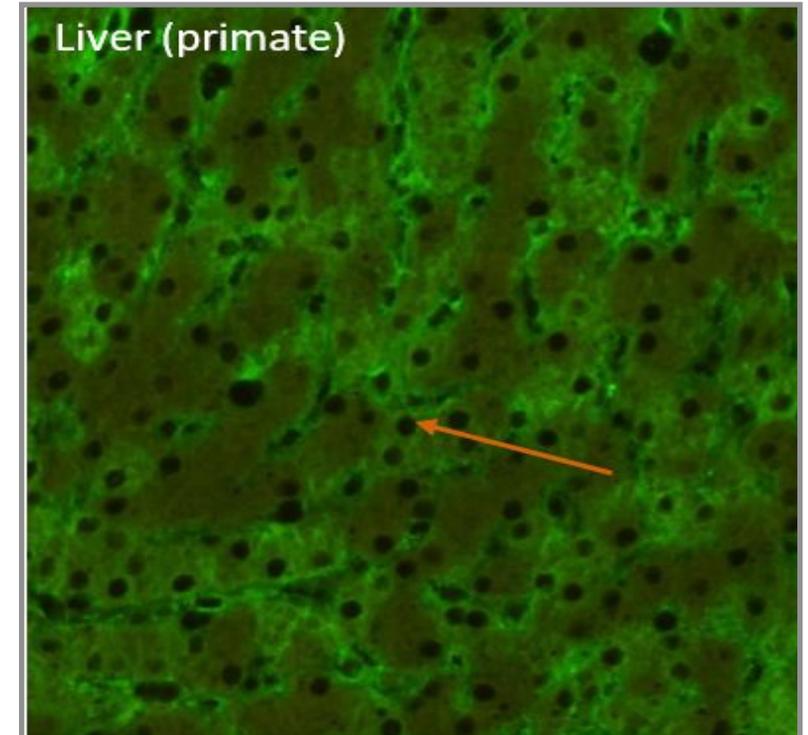
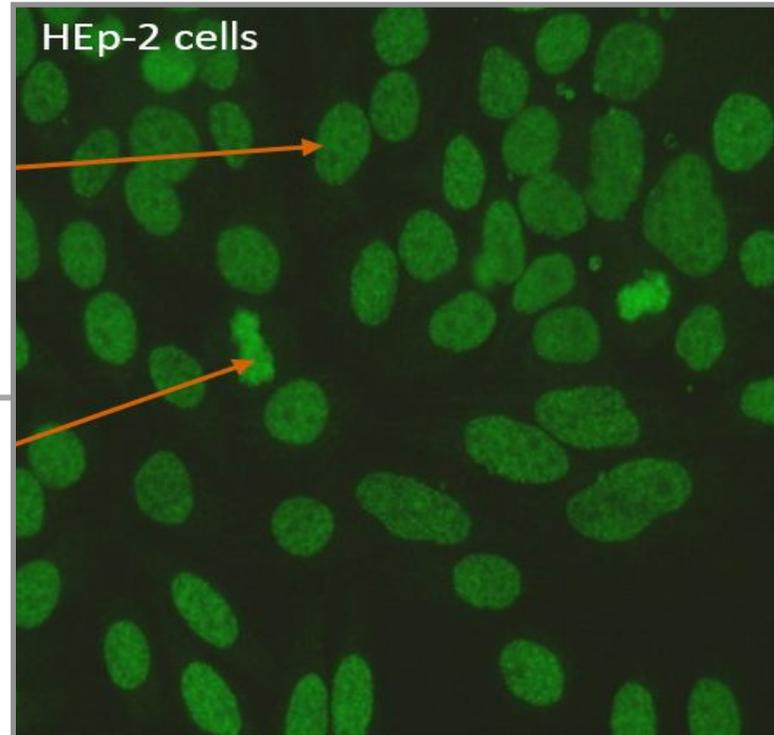
Células HEP-2: Screening.

Hígado de primate: Información adicional.



# AC-2 Nuclear granular fino denso herramientas para diferenciar de AC-1.

- **Interfase:** las células HEp-2 muestran una fluorescencia moteada fina y uniformemente densa del núcleo celular.
- **Mitosis:** Los cromosomas condensados muestran una tinción moteada.

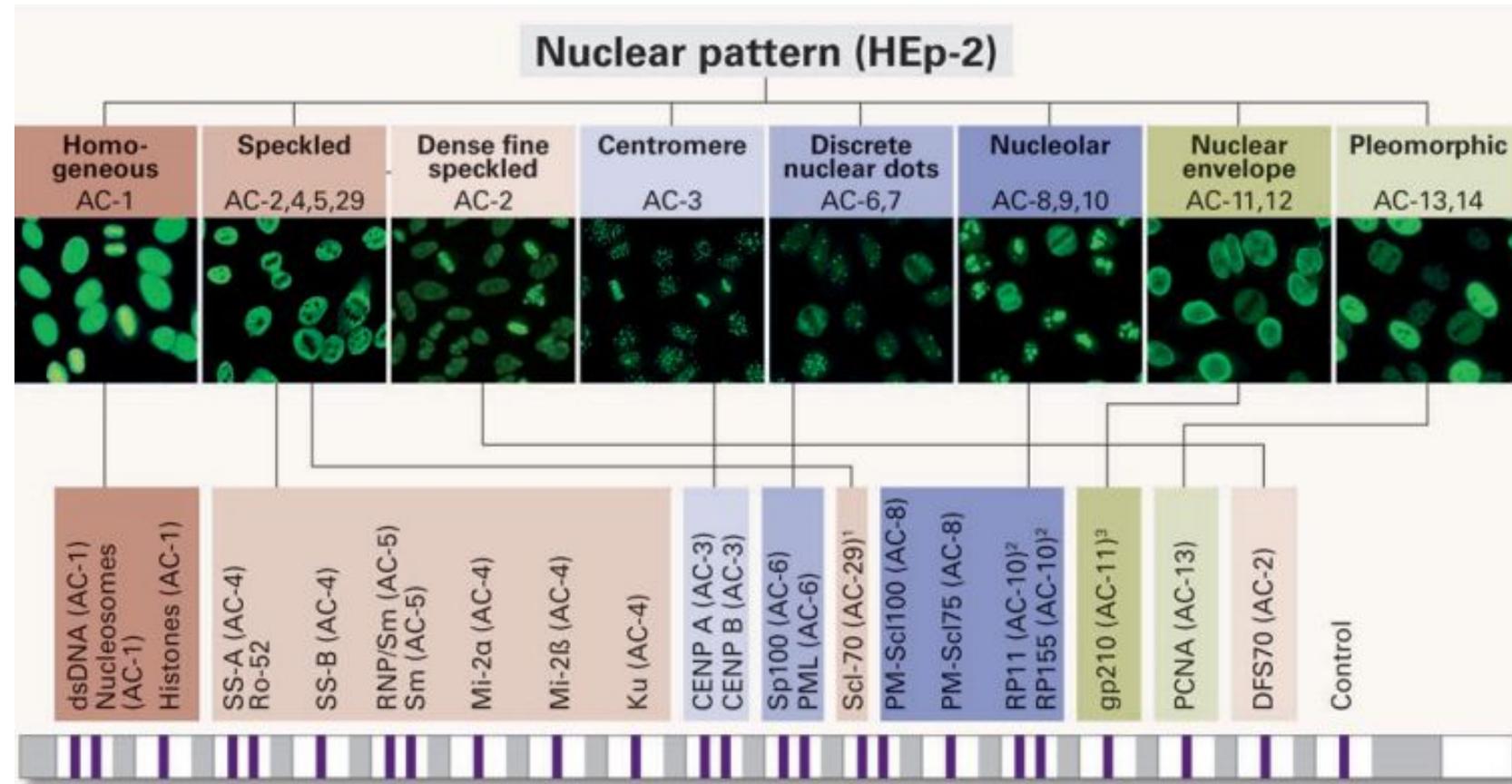


A diferencia del patrón AC-1 Nuclear homogéneo, generalmente arroja núcleos negativos en hígado de primate.

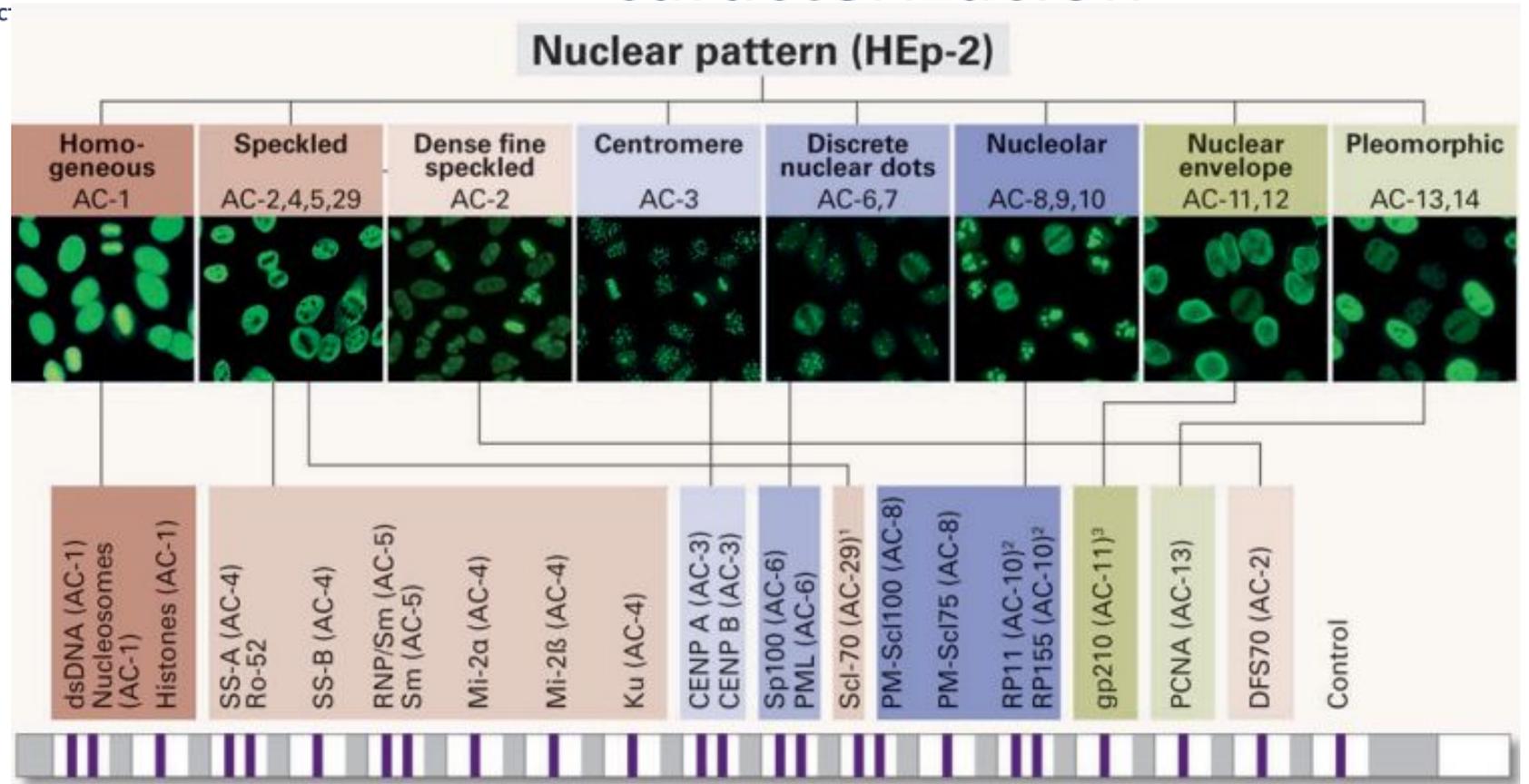
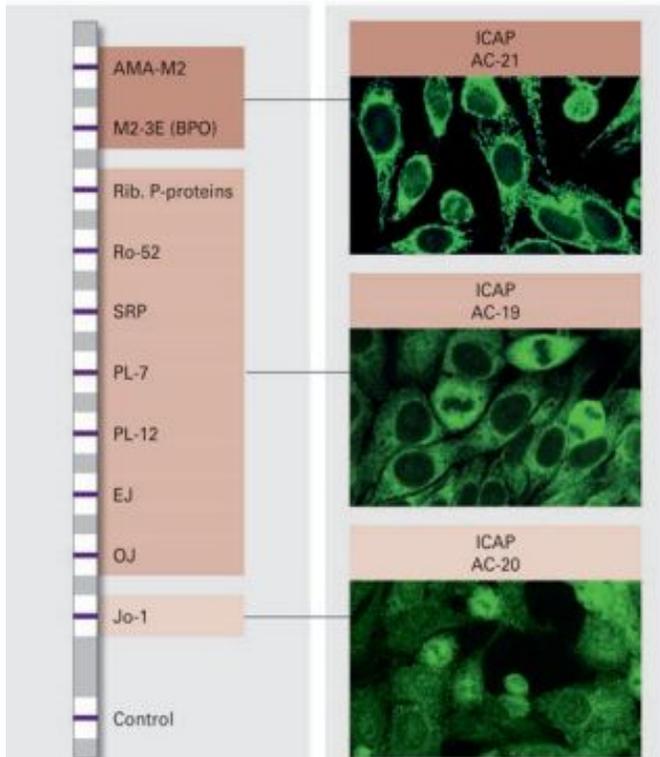


# Desarrollo de ensayos en formato multiplex la clave en la caracterización

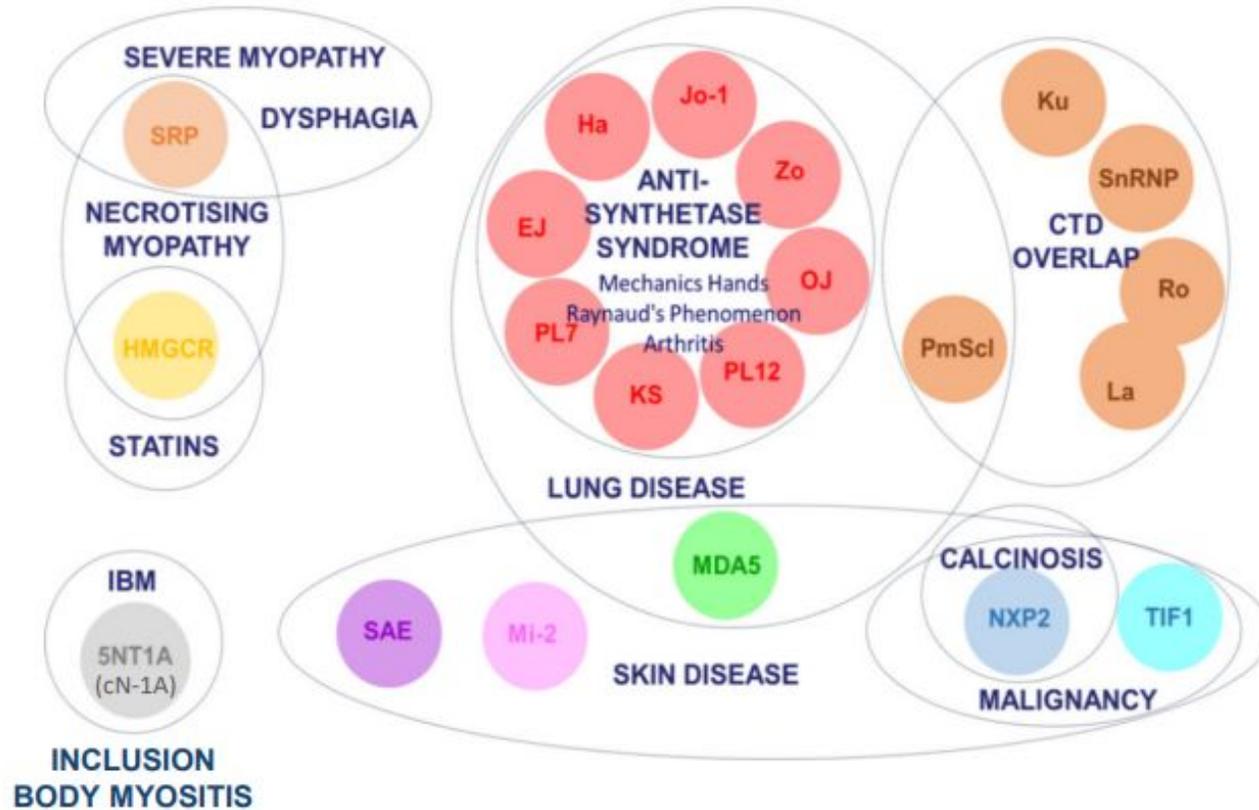
- **Ensayos multiplex:** altamente adecuado para la diferenciación y caracterización monoespecífica de autoanticuerpos, ofreciendo un formato multiplex, facilidad de uso y automatización.
  - A medida que el sistema de clasificación madura, los perfiles pueden adaptarse fácilmente, por ejemplo completándolos con nuevos antígenos importantes.



# Desarrollo de ensayos en formato multiplex la clave en la caracterización



# Desarrollo de ensayos en formato multiplex la clave en la



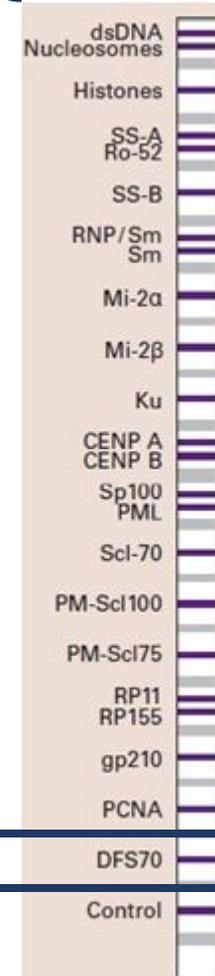
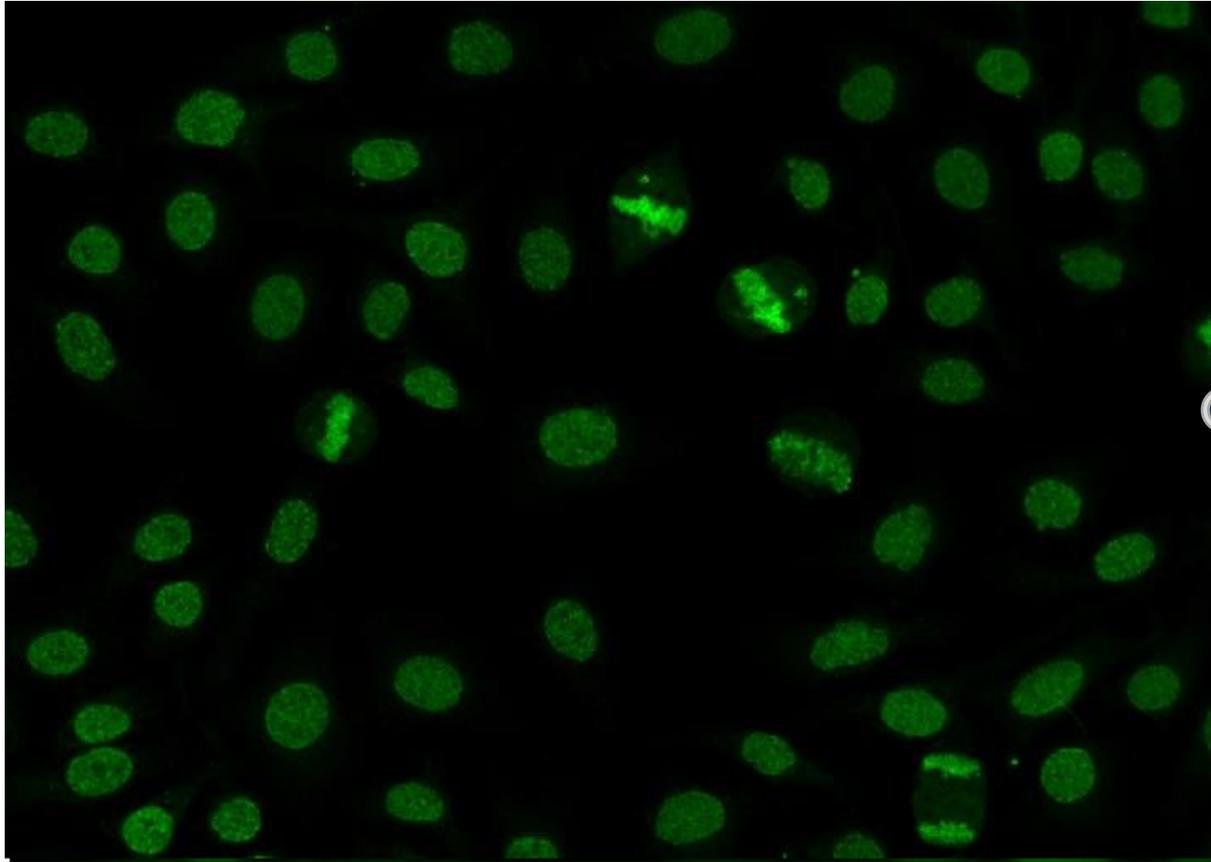
Antibody profiles help to achieve highest serological hit rate



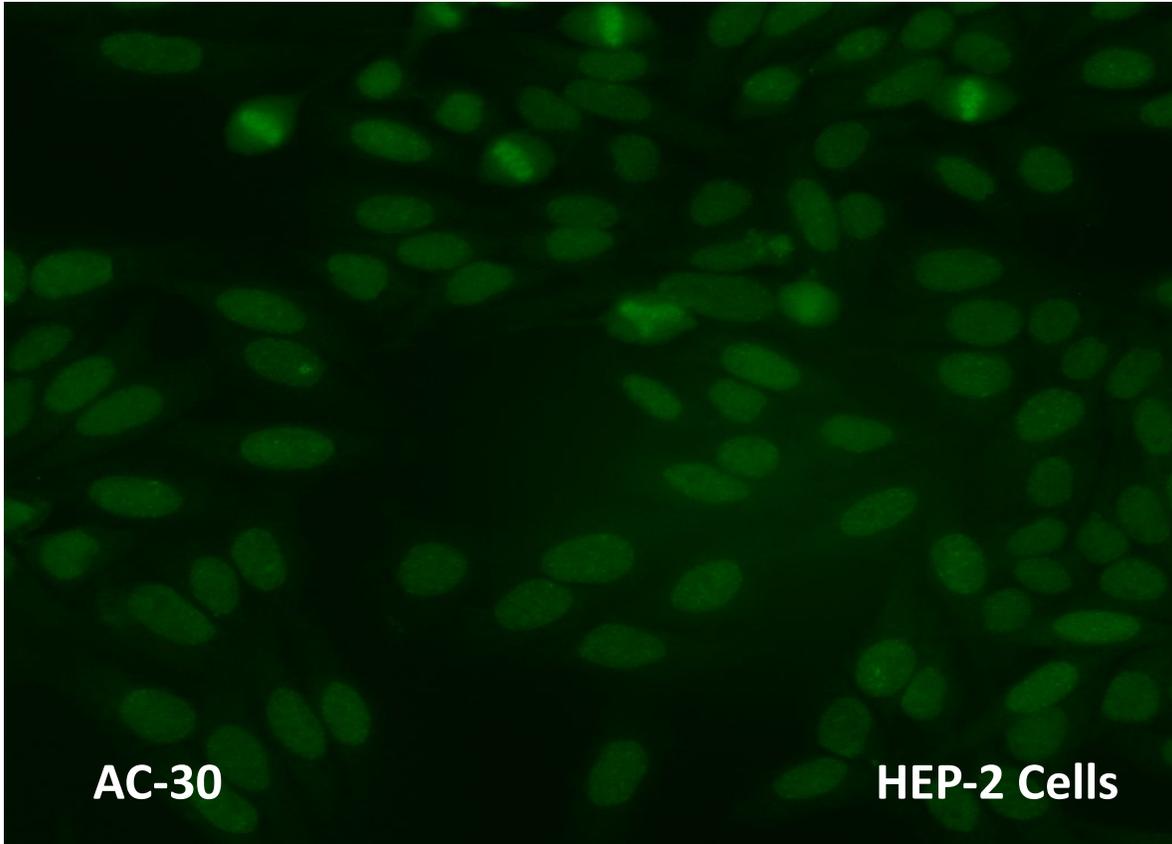
Antibody overview: Schmidt et al. (2018) *J Neuromuscul Dis*; Betteridge et al. (2016) *J Int Med*



# AC-2 Nuclear granular fino denso caracterización inmunológica.



# AC-30 Nuclear granular fino (liso) con placa metafásica teñida.

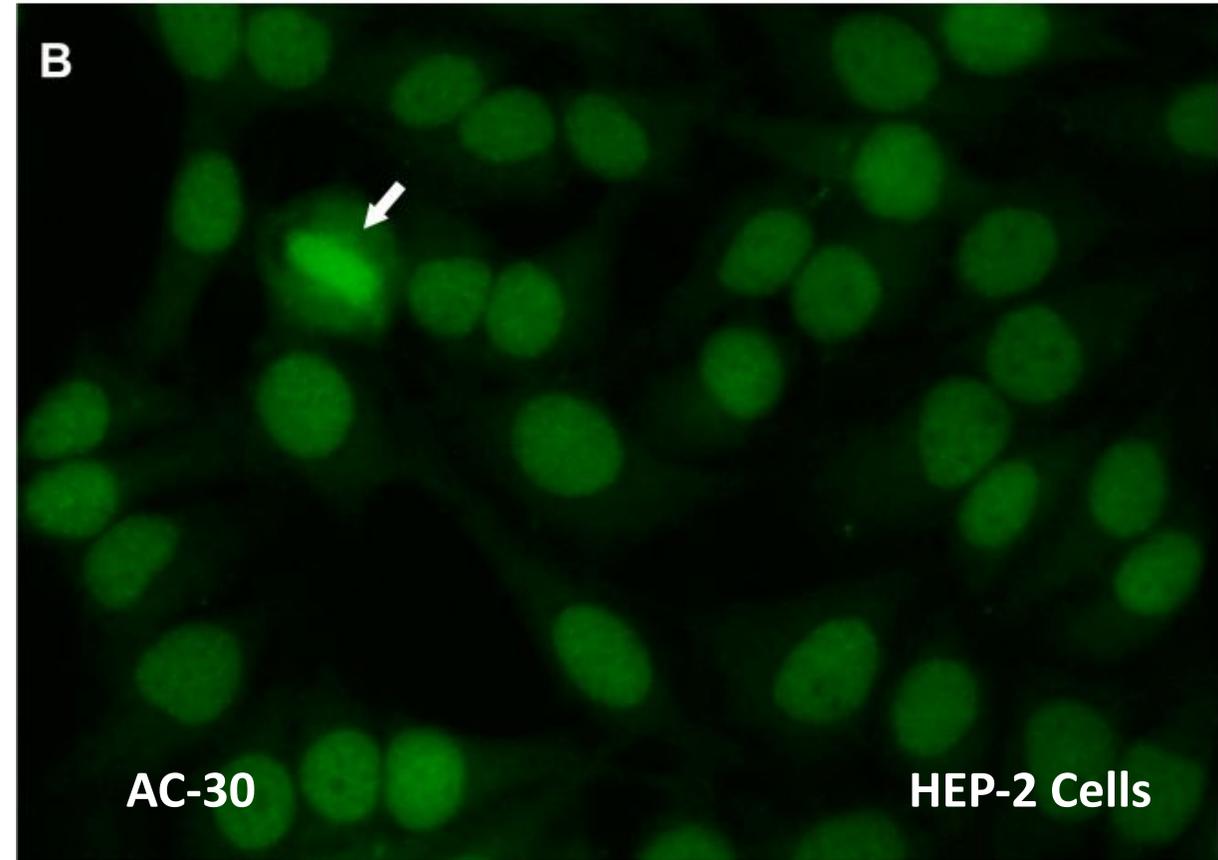
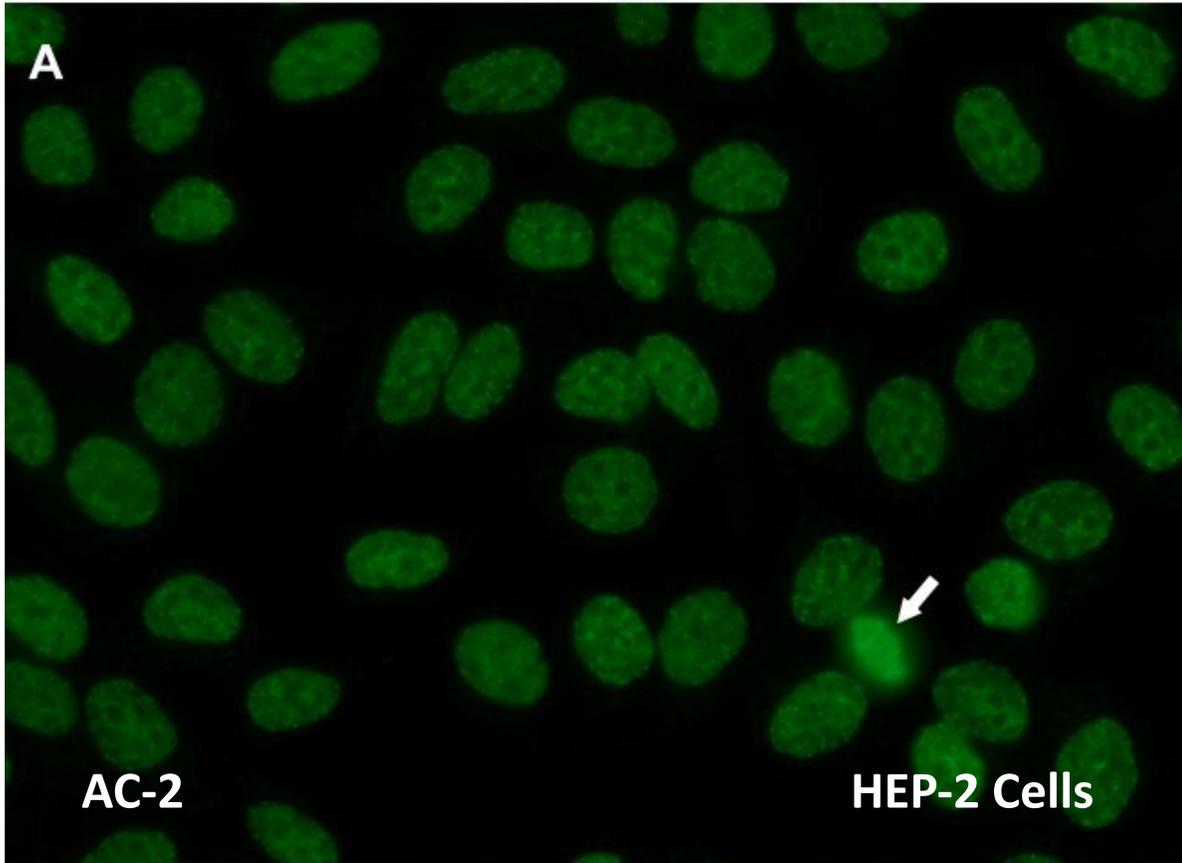


- **Descripción:**

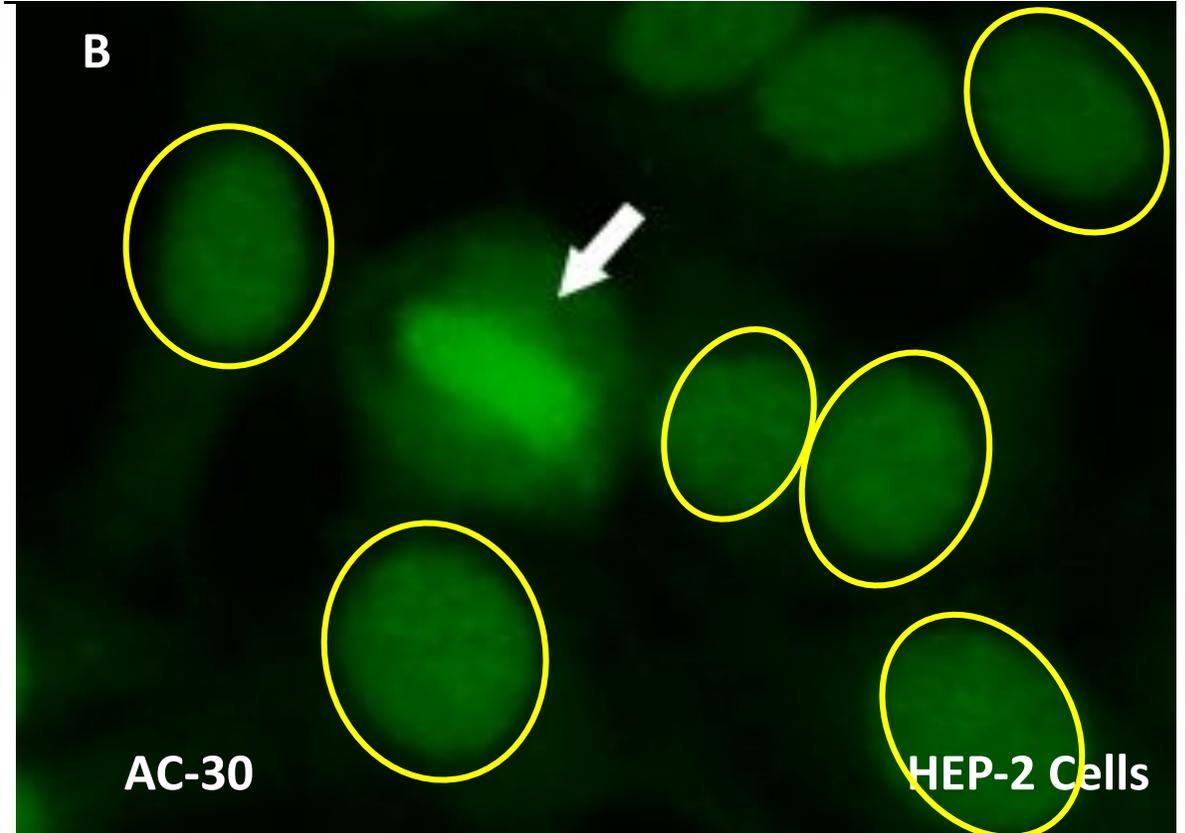
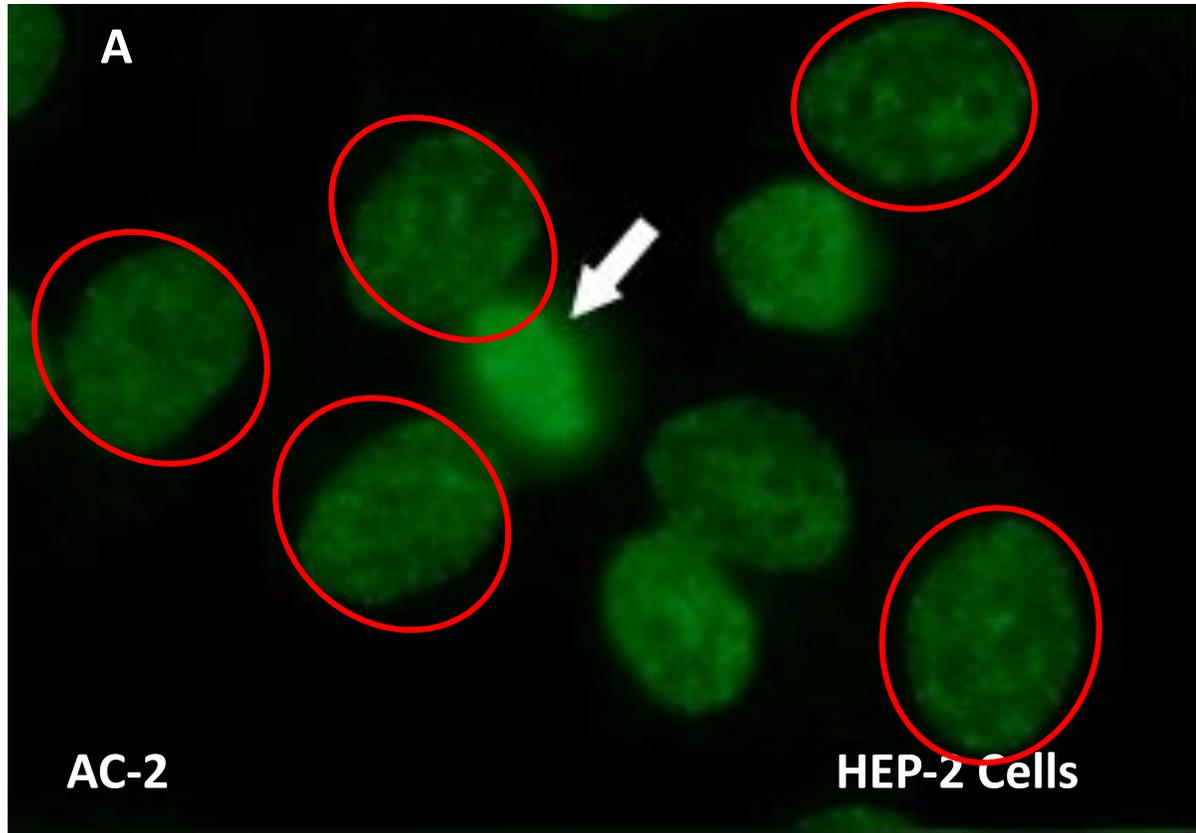
- **Interface:** Patrón granular distribuido por todo el núcleo de las células en interfase, con heterogeneidad en tamaño, brillo y distribución de los gránulos. A lo largo del núcleo en interfase, hay algunas zonas más densas y más débiles de los gránulos (rasgo muy característico). La placa metafásica muestra un fuerte patrón granular destacándose algunas manchas gruesas.
- **Metafase:** placa metafásica positiva.



# AC-2 vs AC-30.

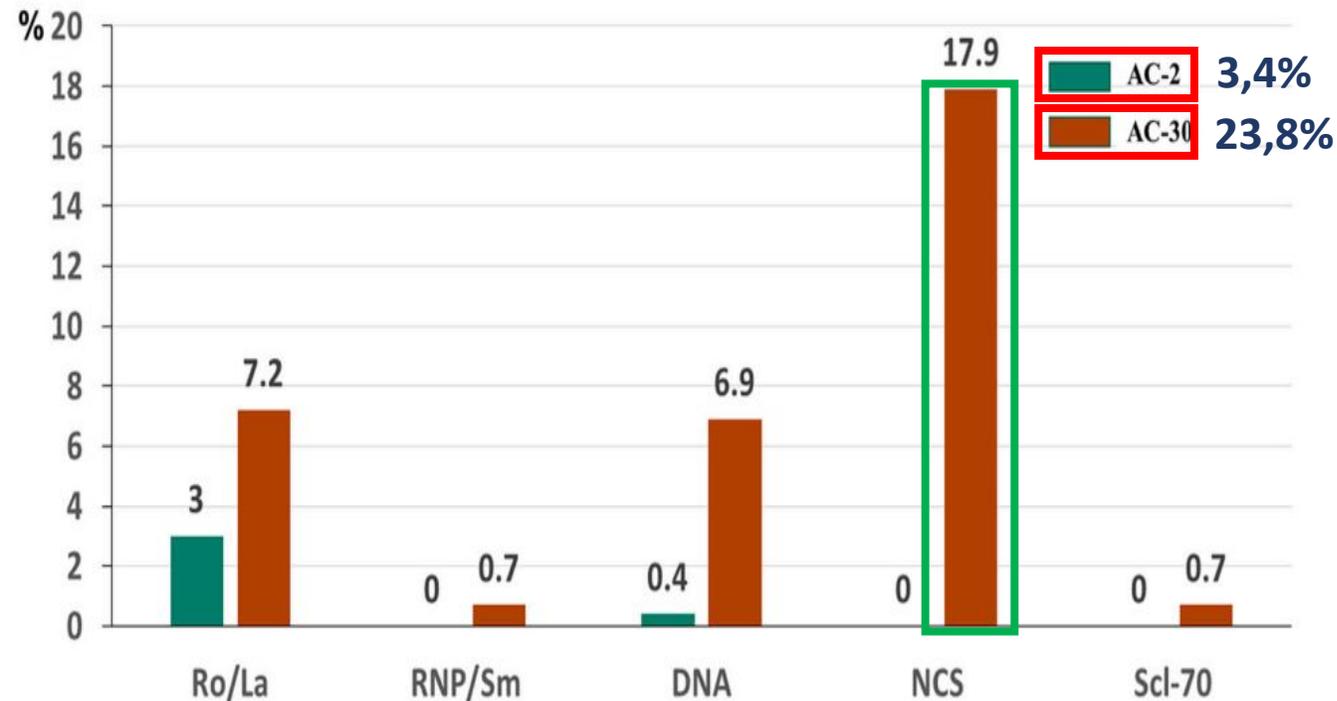


# AC-2 vs AC-30.



# Séptima reunión ejecutiva del taller del ICAP, AC-30: Antígenos asociados.

A Frequency of reactive samples for each autoantibody



- **Análisis retrospectivo: 2560 muestras.**

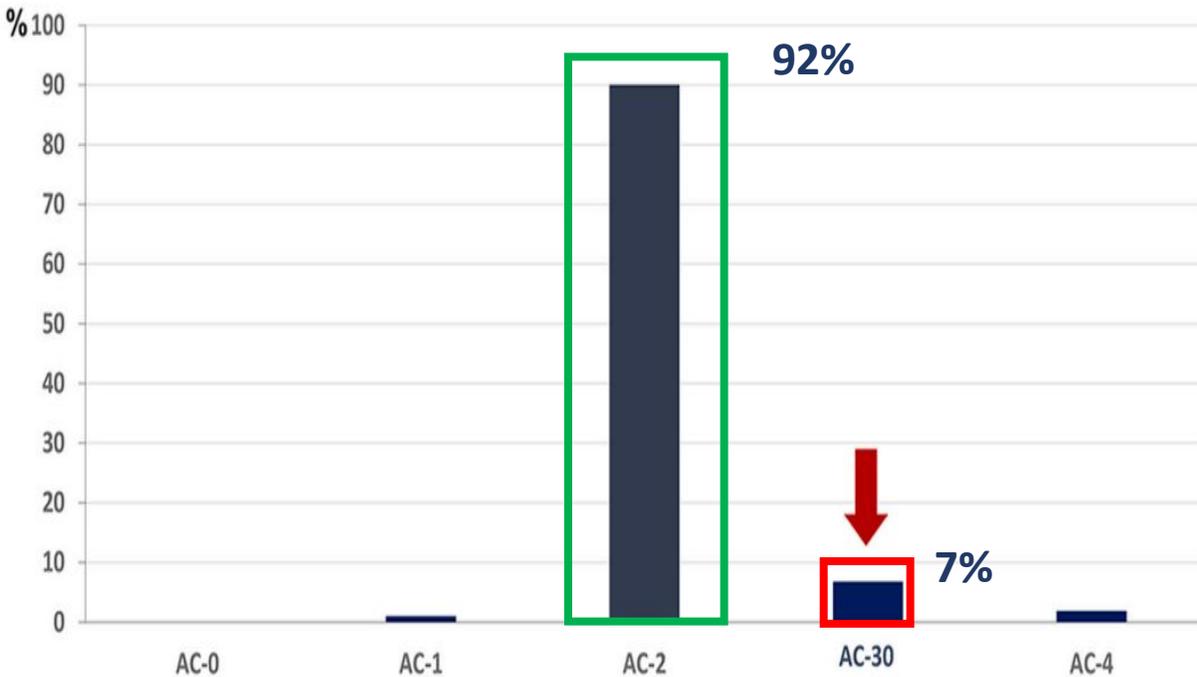
○ Se detectó la presencia de anticuerpos antinucleares relevantes: anti-dsDNA, anti-nucleosoma, anti-Sm, anti-U1-RNP, anti-Scl-70, anti-SS-A/Ro60, anti-SS-B/La) en un 23,8 % de muestras con el patrón AC-30 en comparación con solo el 3,4 % de muestras con el patrón AC-2.

○ Los autoanticuerpos más frecuentes observados en las muestras de AC-30 fueron dirigidos contra nucleosomas, dsDNA y SS-A/Ro60.



## Séptima reunión ejecutiva del taller del ICAP, AC-30: Antígenos asociados.

**B**  
 Frequency of anti-DFS70 reactive samples



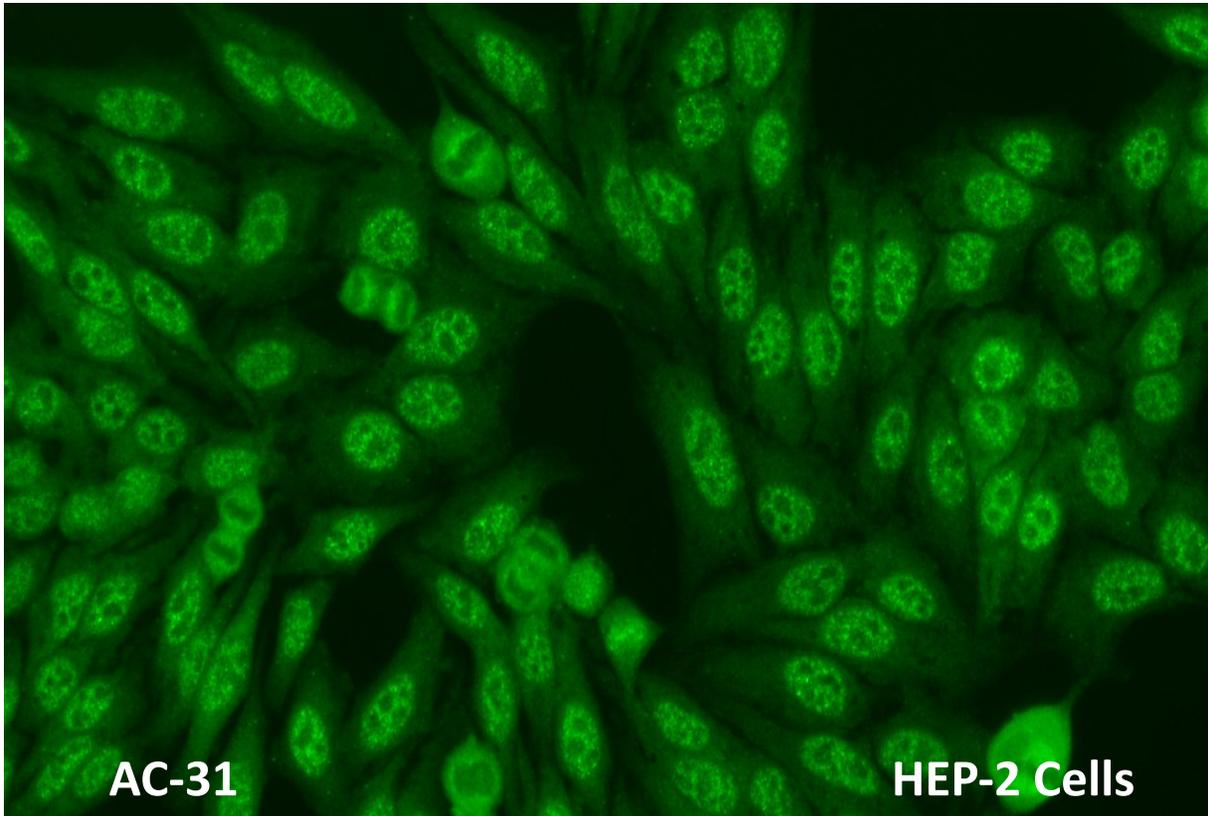
- **Análisis retrospectivo:** 310 muestras para estudio de HEp-2 IFA y anti-DFS70 de manera concomitante.
  - **Asociación inmunológica:** Patrón nuclear AC-2 está fuertemente asociado con anticuerpos anti-DFS-70 y no el patrón nuclear AC-30 (flecha roja).
  - La reactividad se demostró en el 92 % de las muestras de AC-2 y sólo en 7% de las muestras AC-30.



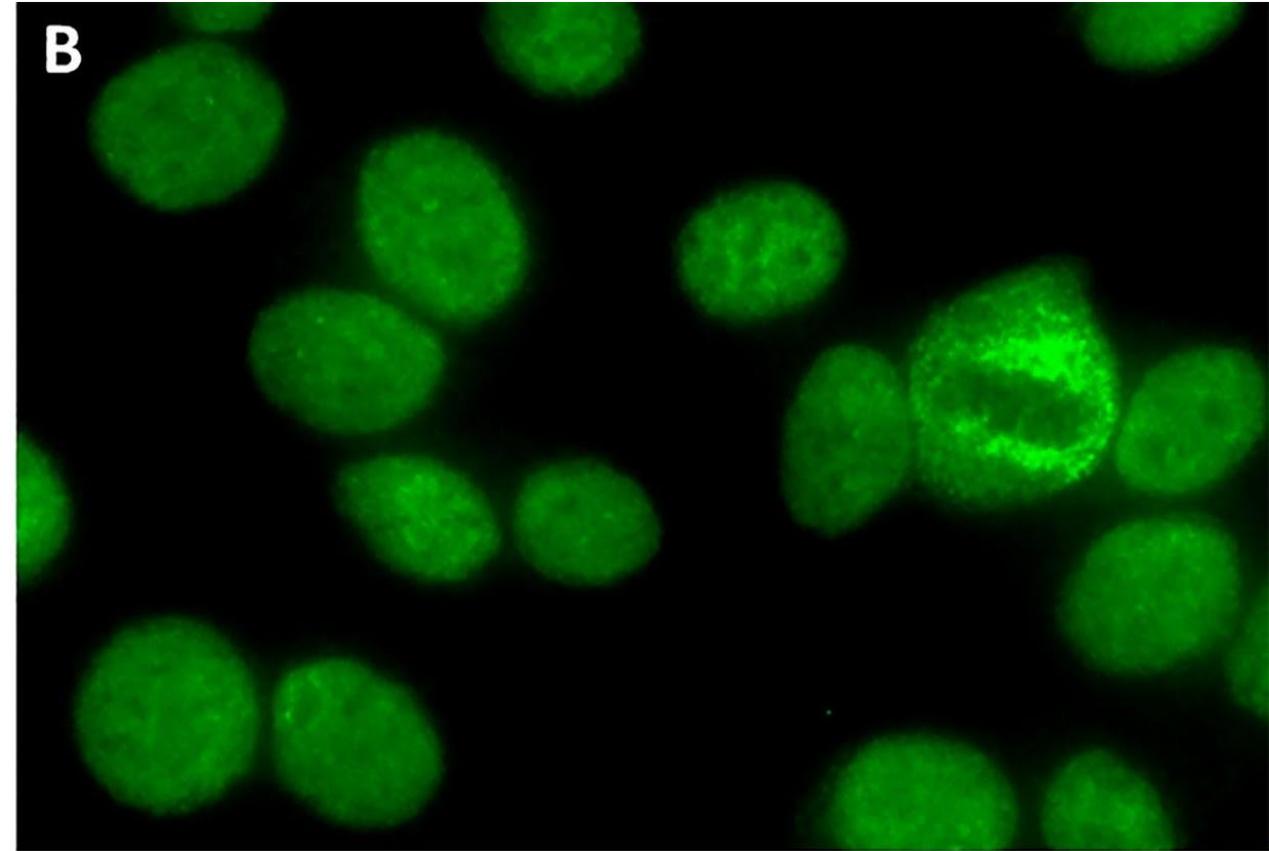
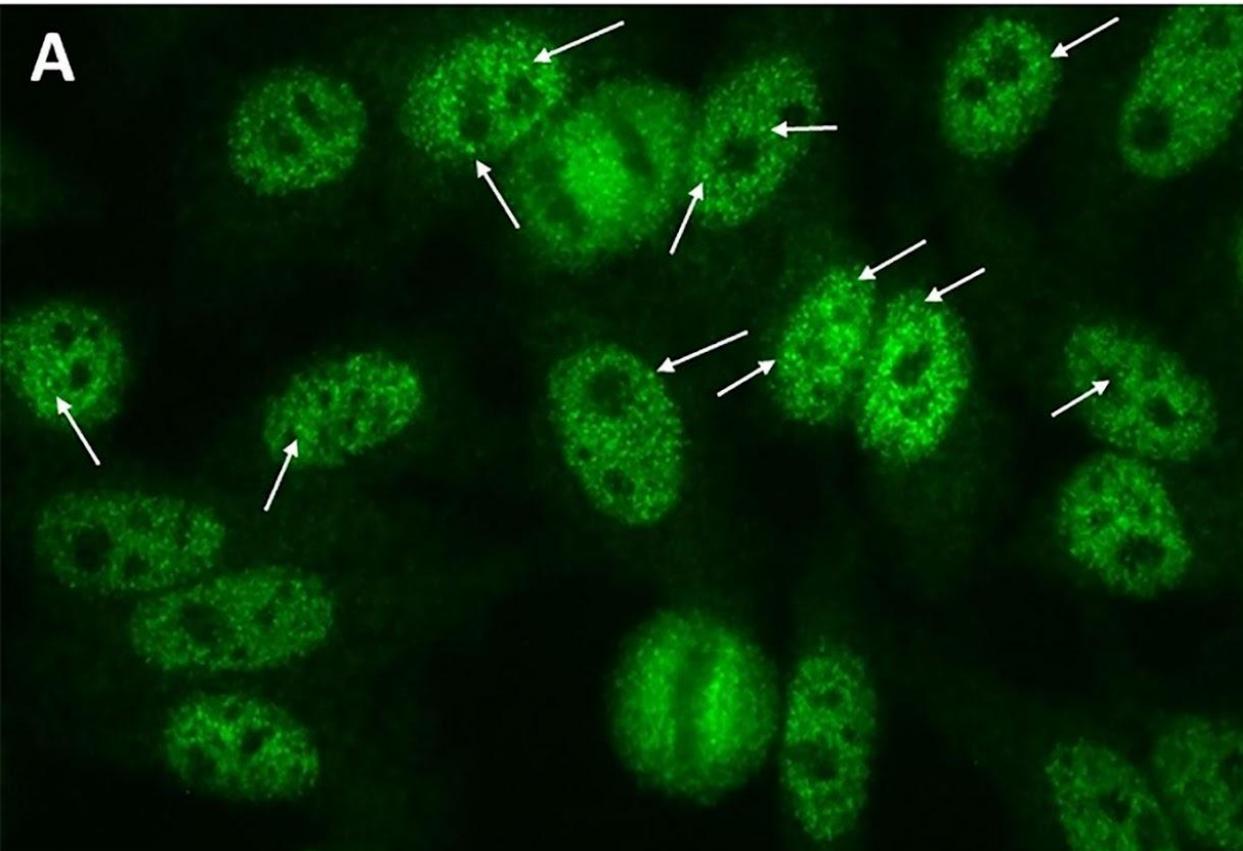
# AC-31 Nuclear granular discreto de múltiples capas.

- **Descripción:**

- **Interface:** patrón granular discreto distribuido por todo el núcleo de las células en interfase, con múltiples motas nucleares discretas.
- **Mitosis:** las células mitóticas (metafase, anafase y telofase) no tienen la masa de la cromatina teñida (cromatina negativa).



# AC-31 Nuclear granular discreto de múltiples capas.



# AC-31 Nuclear granular discreto de múltiples capas.

## Strong Association of the Myriad Discrete Speckled Nuclear Pattern With Anti-SS-A/Ro60 Antibodies: Consensus Experience of Four International Expert Centers

Nadja Röber<sup>1</sup>, Alessandra Dellavance<sup>2</sup>, Fernanda Ingénito<sup>3</sup>, Marie-Luise Reimer<sup>1</sup>, Orlando Gabriel Carballo<sup>3</sup>, Karsten Conrad<sup>1</sup>, Edward K. L. Chan<sup>4</sup> and Luis E. C. Andrade<sup>5,6\*</sup>

OPEN ACCESS

Edited by:

Efstathia K. Kapsogeorgou,  
National and Kapodistrian University of  
Athens, Greece

<sup>1</sup> Institute of Immunology, Technical University Dresden, Dresden, Germany, <sup>2</sup> Division of Research and Development, Fleury Medicine and Health Laboratories, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup> Immunology Laboratory, Durand Hospital, Buenos Aires, Argentina, <sup>4</sup> Department of Oral Biology, University of Florida, Gainesville, FL, United States, <sup>5</sup> Division of Immunology, Fleury Medicine and Health Laboratories, São Paulo, Brazil, <sup>6</sup> Division of Rheumatology, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brazil

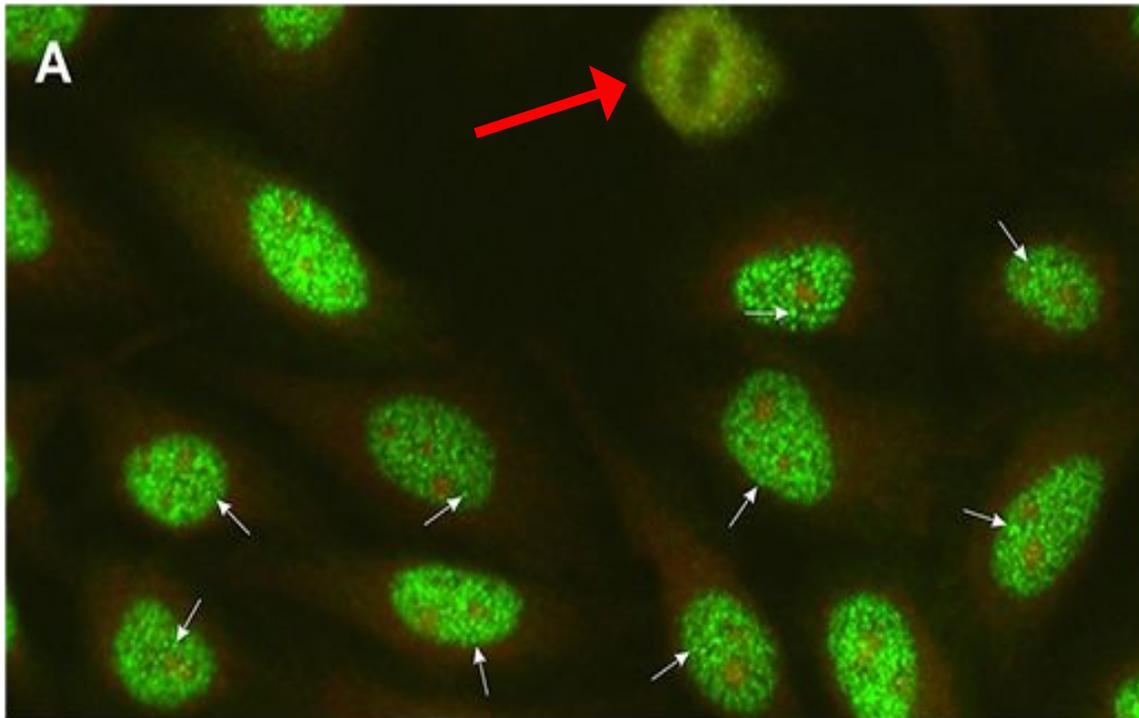
### • Antecedentes:

- Subclasificación del patron AC-4: Variante **AC-4a** y variante **AC-4b**.
- Antígeno asociado: RSS-A/Ro-60.

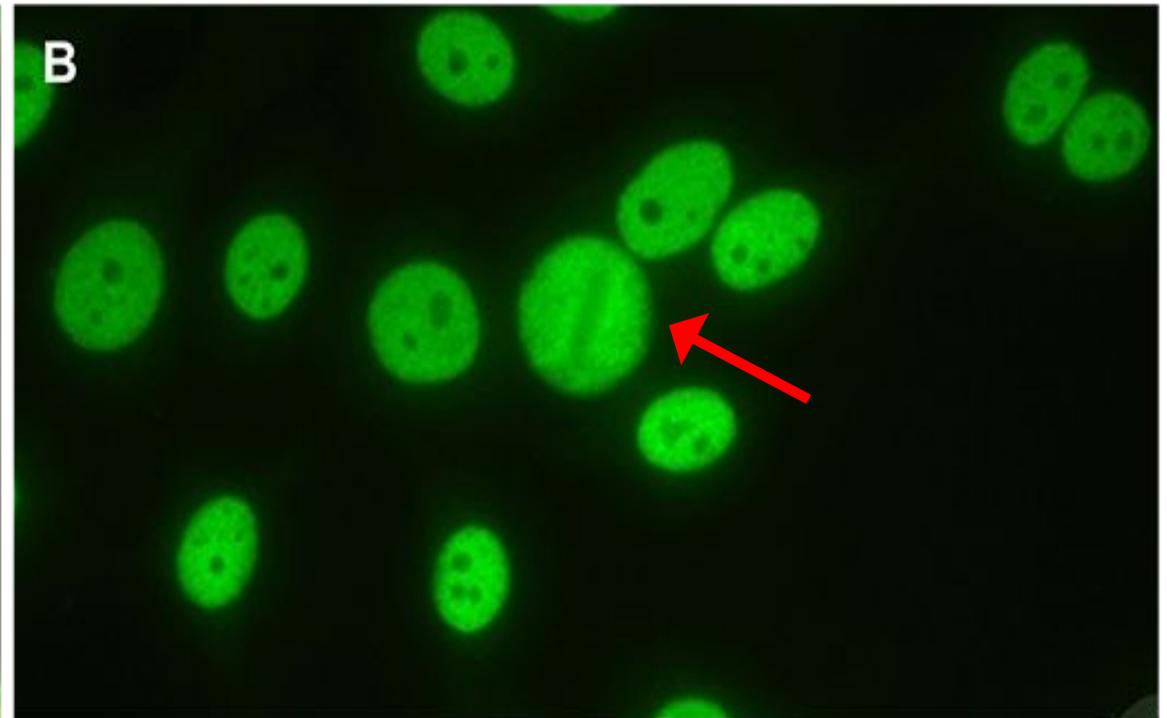


# AC-31 Nuclear granular discreto de múltiples capas.

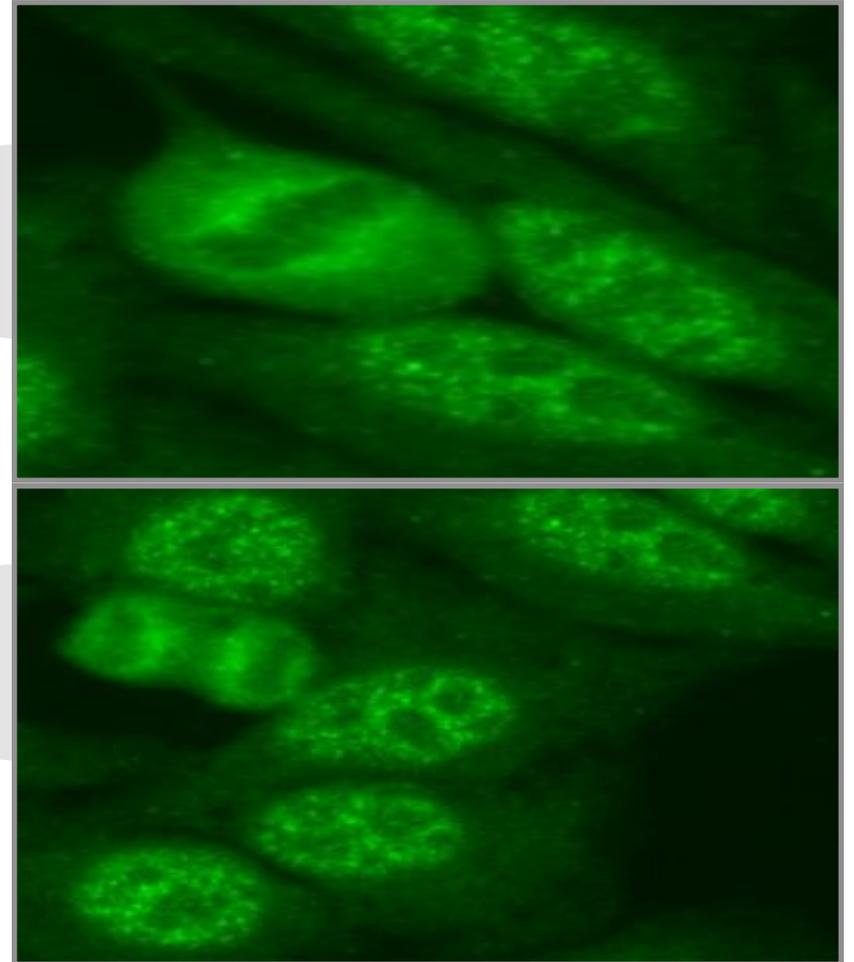
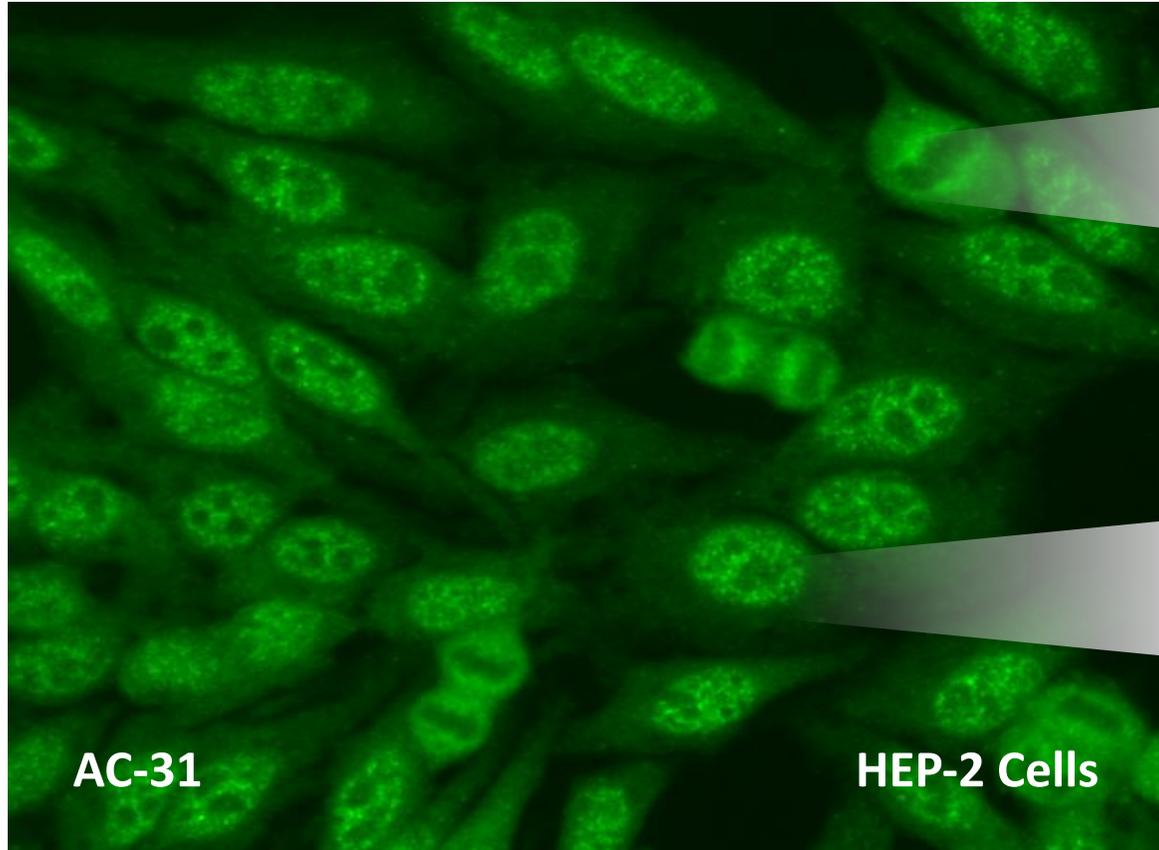
## • Variante AC-4a.



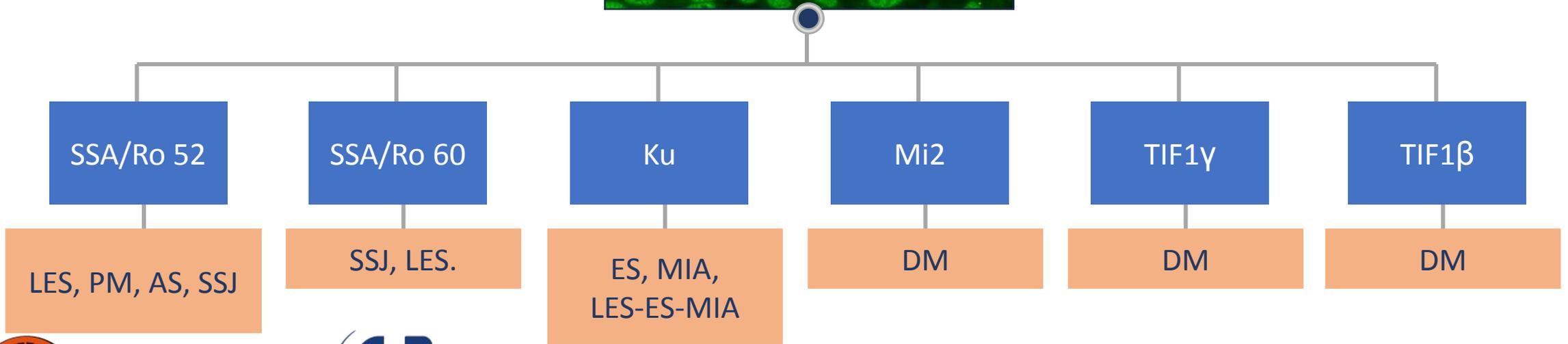
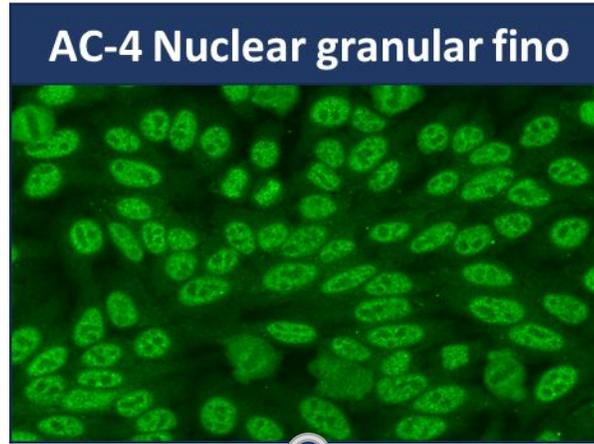
## • Variante AC-4b.



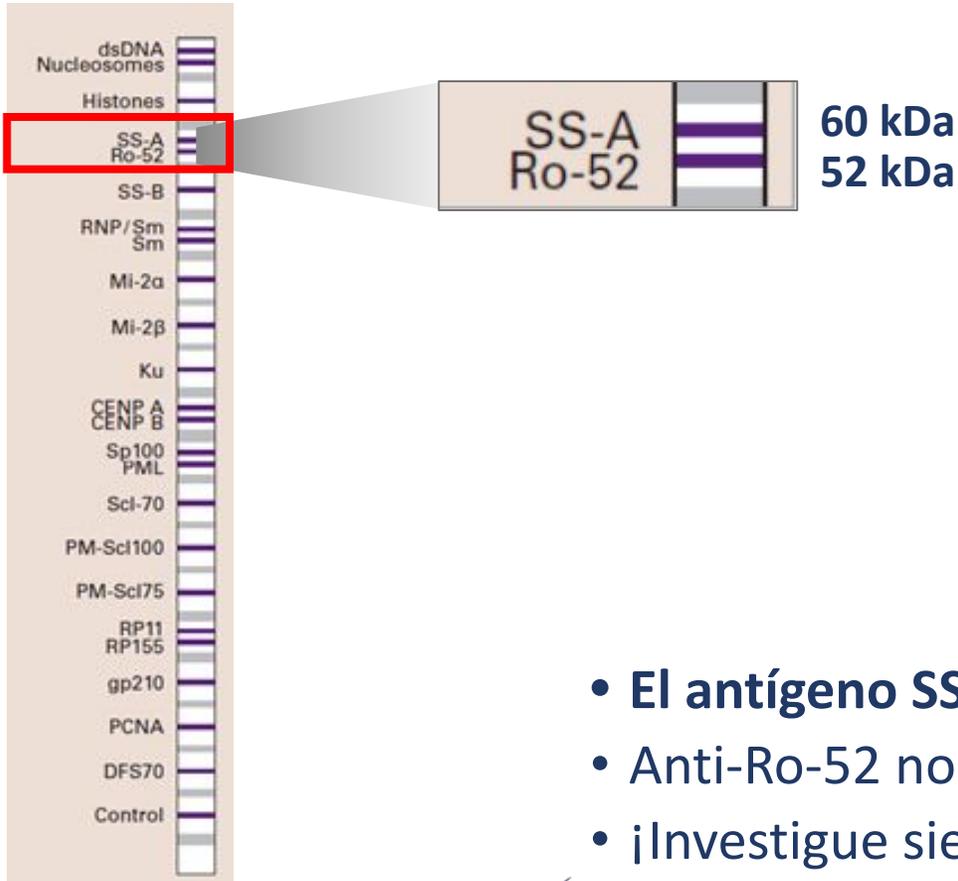
# AC-31 Nuclear granular discreto de múltiples capas.



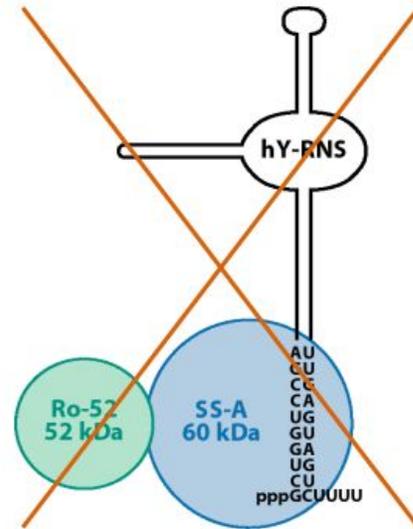
# AC-31 Nuclear granular discreto de múltiples capas.



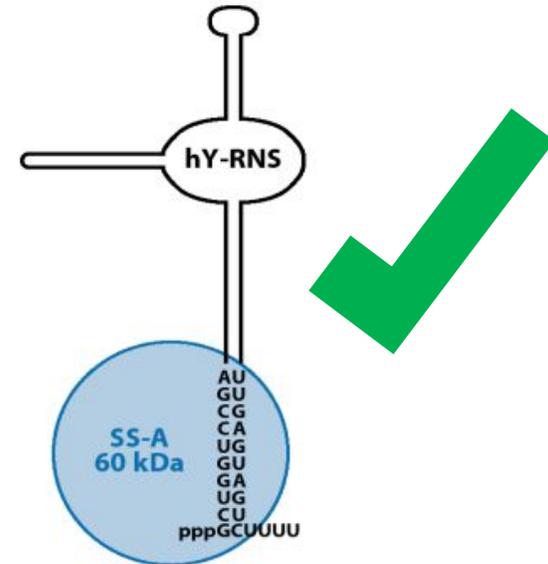
# AC-31 Nuclear granular discreto de múltiples capas.



RNA + SS-A & Ro-52



RNA + SS-A



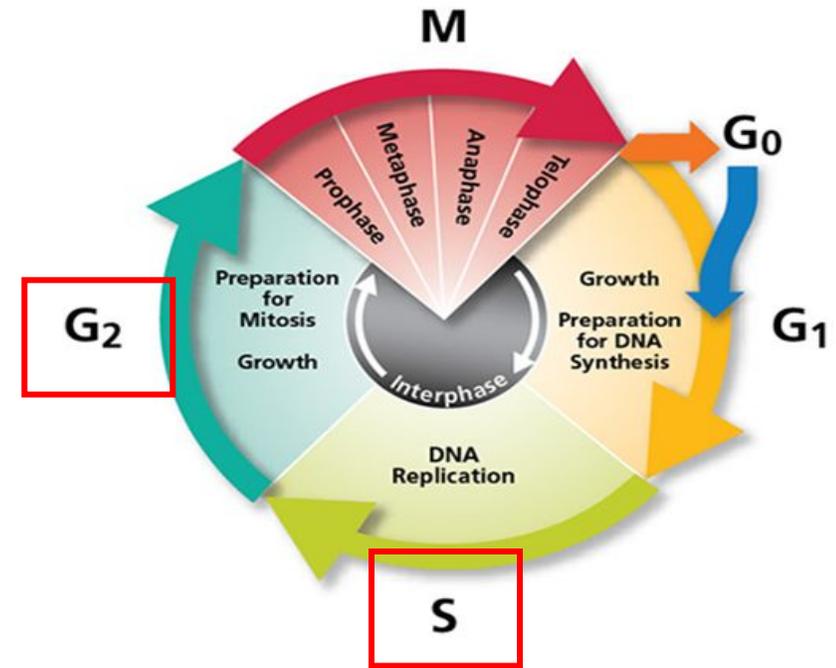
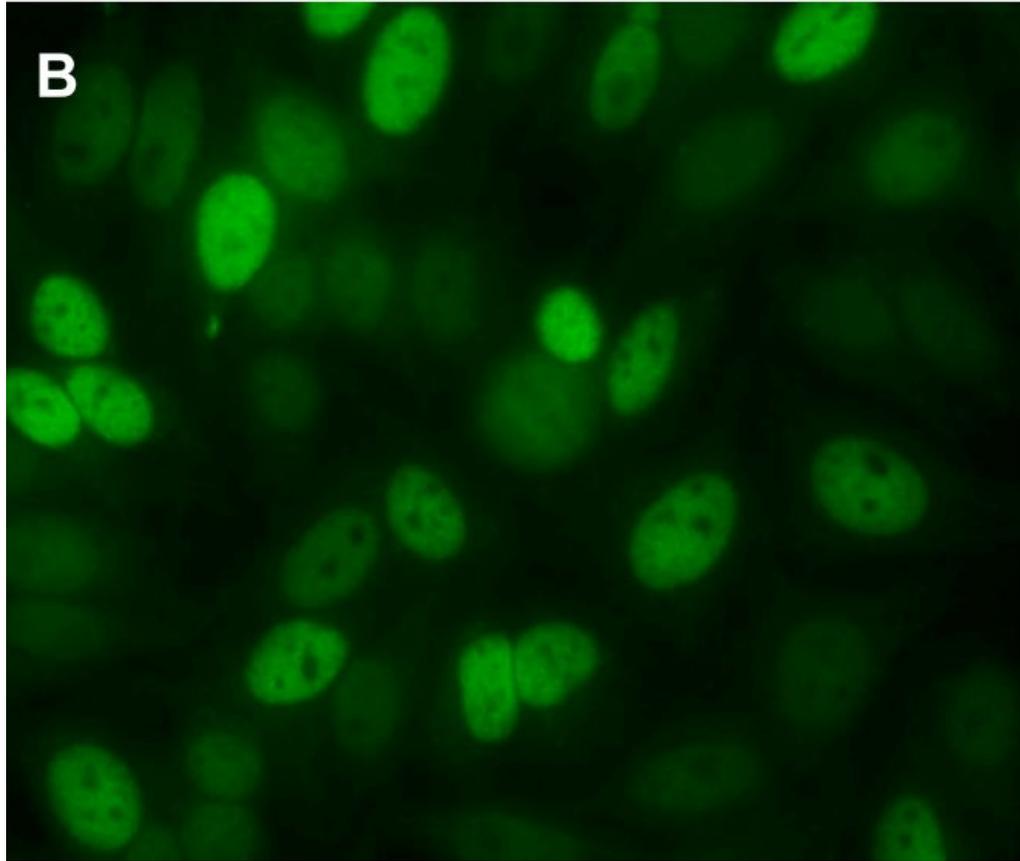
- El antígeno SS-A nativo purificado no contiene Ro-52.
- Anti-Ro-52 no se dirige al antígeno nativo SS-A (60 kDa).
- ¡Investigue siempre el anti-SS-A (60 kDa) y el anti-Ro-52 por separado!



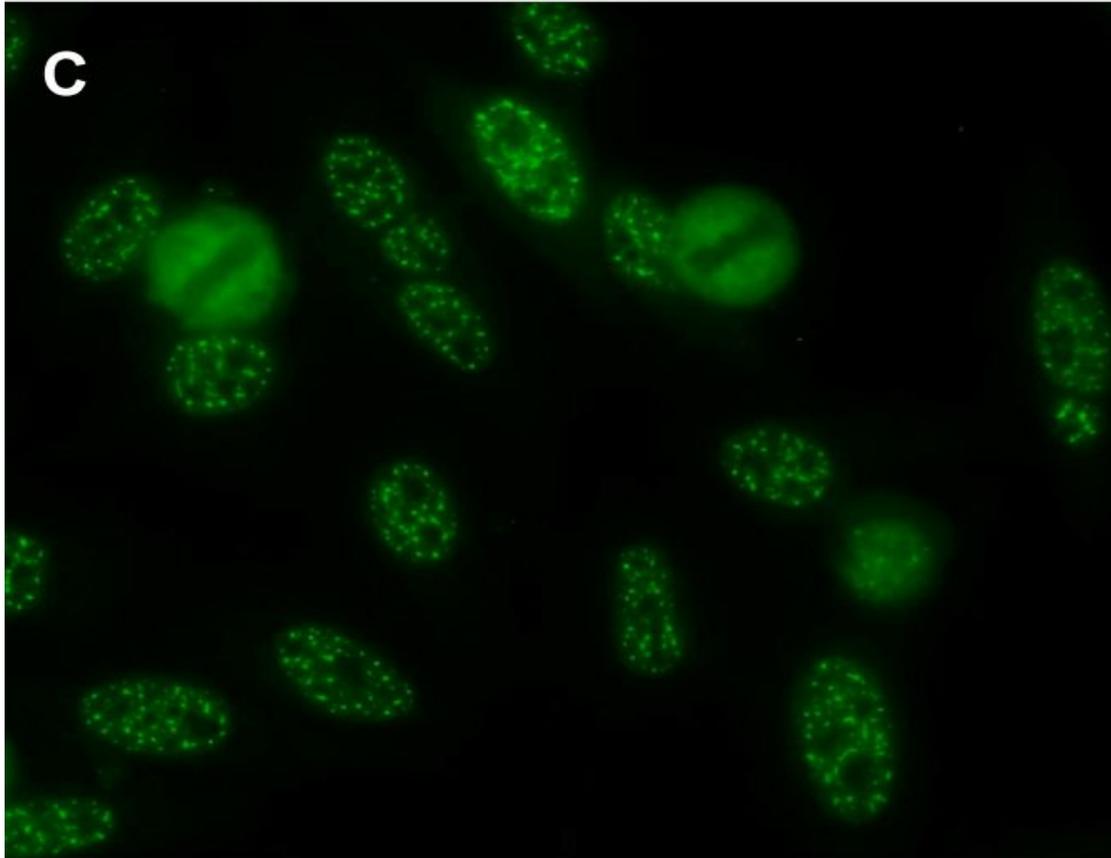
# HEP-2 CIC PROJET:

## Patrón nuclear SG2NA AC-XX

- También llamado patrón de fase nuclear del ciclo celular S/G2.



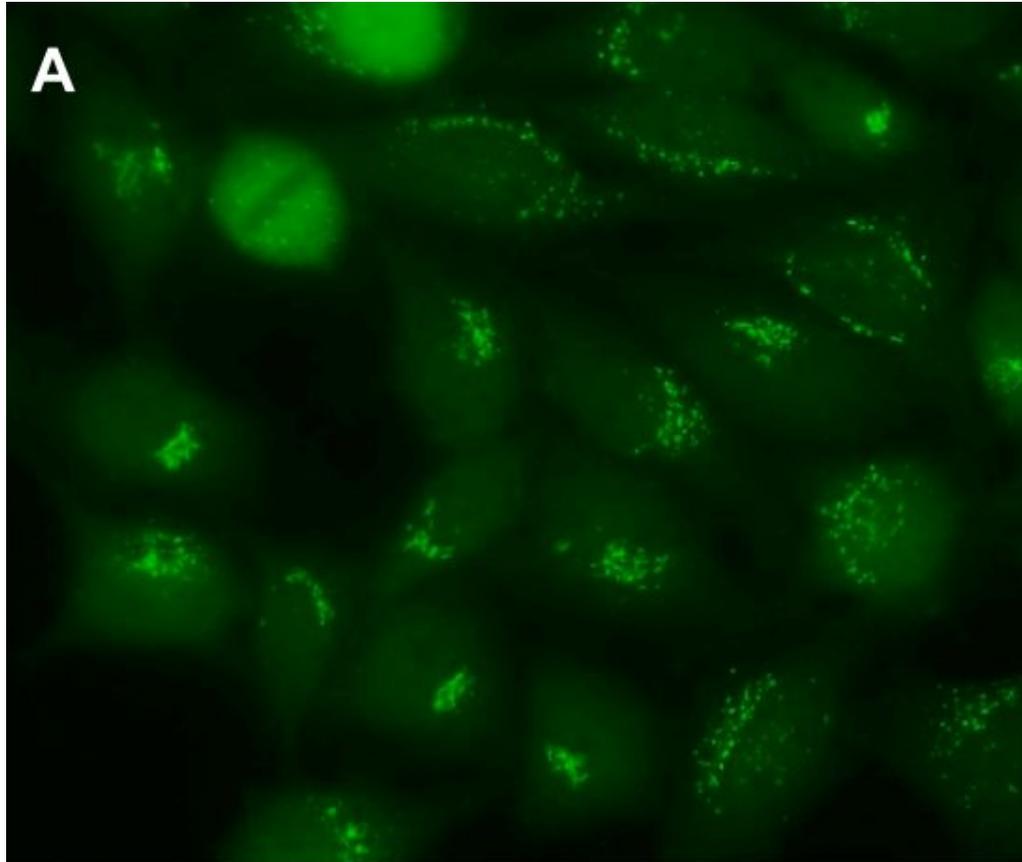
## HEP-2 CIC PROJET: Patrón de matriz nuclear AC-XX



- **Interfase:** Gránulos gruesos discretos que se distribuyen de manera heterogénea por todo el nucleoplasma.
- **Mitosis:** Placa metafásica negativa.



## HEP-2 CIC PROJET: AC-22 Citoplasmático granular polar/parecido a aparato de Golgi.



- **Antígenos asociados:**  
Giantina/macrogolgina, golgin-95/GM130, Golgina-160, golgina-97, golgina 245.
- Se encuentran en un pequeño número de pacientes con una variedad de condiciones.
- No están comercialmente disponibles





**VI CONGRESO LATINOAMERICANO  
DE BIOQUIMICA CLÍNICA**

**II CONGRESO INTERNACIONAL DEL  
COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA**

*¡El riesgo es que te quieras quedar!*

**Cartagena, Colombia 3 al 6 OCTUBRE 2024**

**¡Muchas gracias por su atención, a todos: heroes saliendo de las sombras tras microscopios, pipetas y tubos de ensayo!**