

Concordancia entre la determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia e inmunoensayo lineal

Concordance between antinuclear antibody determination by immunofluorescence and line immunoassay

Claudia Patricia Benítez¹, Olga Lucía Rincón Caballero²,
Julio César Quintero³, Beatriz Helena Aristizábal⁴

1. Estudiante Microbiología y Bioanálisis, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.
2. Bacterióloga, MSc. Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.
3. Microbiólogo y Bioanálisis en Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.
4. Bacterióloga, MSc, PhD. Coordinadora Laboratorio de Biología Molecular, Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia.

Correspondencia: Beatriz H. Aristizábal B. Calle 78 B N° 69-240 Hospital Pablo Tobón Uribe, Medellín, Colombia. E.mail: baristizabal@hptu.org.co.

Conflicto de intereses: los autores declararon no tener conflicto de intereses.

Medicina & Laboratorio 2011; 17: 429-443.

Módulo 19 (Investigación), número 9. Editora Médica Colombiana S.A., 2010®.

Recibido el 25 de abril de 2011; revisado el 27 de mayo de 2011; aceptado el 16 de junio de 2011.

Resumen: Introducción: la inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células Hep-2 es la prueba usada para la tamización de autoanticuerpos en enfermedades del tejido conectivo, en tanto que el perfil de anticuerpos específicos se puede detectar por métodos inmunométricos como el inmunoensayo lineal en soporte sólido (LIA).

Objetivos: 1) evaluar el desempeño de un LIA comercial en el suero de pacientes, y compararlo con la determinación de anticuerpos antinucleares por IFI; 2) describir el perfil de los autoanticuerpos detectados por las dos pruebas; y 3) conocer la frecuencia de los diferentes autoanticuerpos en los pacientes evaluados. **Materiales y métodos:** se incluyeron 72 pacientes consecutivos, con sospecha de enfermedad autoinmune, que consultaron en el Hospital Pablo Tobón Uribe en Medellín, Colombia. Las muestras fueron procesadas por IFI y por LIA. **Resultados:** el patrón homogéneo y el moteado fueron los más frecuentes en estos pacientes. Los anticuerpos específicos que prevalecieron fueron los anti-histonas, anti-nucleosomas y anti-dsDNA; estos hallazgos eran esperables pues son los anticuerpos que se asocian al patrón homogéneo, que fue el más prevalente. Se encontró una concordancia del 68,05% entre los resultados por ambos métodos. **Conclusiones:** la baja concordancia entre las dos pruebas, menor que la reportada en la literatura (90%), pudo ser el resultado de la baja probabilidad pre-test de los pacientes incluidos en el estudio. Entre las ventajas del LIA se encuentra que acorta el tiempo del diagnóstico y del inicio del tratamiento, su mayor sensibilidad y especificidad, y la posibilidad de identificar los anticuerpos específicos de manera individual, además de detectar anticuerpos extraíbles que no son identificados por IFI.

Palabras clave: autoanticuerpos antinucleares, enfermedad autoinmune, inmunofluorescencia indirecta, inmunoensayo lineal en soporte sólido.

Abstract: Introduction: Indirect immunofluorescence (IFI) on Hep-2 cells is the test used for screening autoantibodies in connective tissue diseases, while the profile of specific antibodies can be detected by immunometric methods such as solid support line immunoassay (LIA). **Objectives:** 1) To evaluate the performance

of a commercial LIA on serum of patients, and compare it with the determination of antinuclear antibodies by IFI, 2) to describe the profile of the autoantibodies detected by both tests, and 3) to determine the frequency of the different autoantibodies in the evaluated patients. **Materials and methods:** We included 72 consecutive patients with suspected autoimmune disease that consulted the Pablo Tobón Uribe Hospital in Medellín, Colombia. The samples were processed by IFI and LIA. **Results:** The homogeneous and speckled patterns were more common in these patients. The most prevalent specific antibodies were the anti-histone, anti-nucleosome and anti-dsDNA; these findings were expected because these are the antibodies associated with the homogeneous pattern, which was the most prevalent. There was a 68,05% concordance between the results by both methods. **Conclusions:** The low concordance between the two tests, lower than that reported in the literature (90%), could be the result of low pre-test probability of the patients included in the study. The advantages of LIA include that it allows shortening the time of diagnosis and initiation of treatment, its highest sensitivity and specificity, and the ability to individually identify specific antibodies, as well as to detect extractable antibodies that are not identified by IFI.

Key words: Antinuclear antibodies, autoimmune disease, indirect immunofluorescence assay, solid support line immunoassay.

Introducción

Las enfermedades autoinmunes son un grupo de desórdenes caracterizados por el desarrollo de una respuesta inmune humoral y celular contra varios constituyentes propios [1]. Una característica importante es la producción de autoanticuerpos de alta afinidad [2]. La presencia de los autoanticuerpos es un parámetro fundamental en el diagnóstico y clasificación de la enfermedad autoinmune; por ejemplo, la detección de anticuerpos antinucleares (ANA), anti-Sm, anti-DNA de cadena doble (anti-dsDNA) y anti-cardiolipina (aCL) en lupus eritematoso sistémico (LES) [3]; la presencia de anti-Ro (SS-A) y anti-La (SS-B) en el síndrome de Sjögren [3]; y la determinación de anticuerpos anti-cardiolipina y anti- β 2-glicoproteína 1 en el síndrome antifosfolípido [4]. En algunos casos los autoanticuerpos adquieren valor pronóstico en el progreso de la enfermedad, por lo que se requiere del monitoreo constante de los mismos, ejemplo de ello son los anti-dsDNA en el LES [5] y los anticuerpos anti-neutrófilo citoplasmático (ANCA) en vasculitis [4, 6-8]. Además de su valor pronóstico, los autoanticuerpos pueden aparecer mucho antes de desarrollarse la enfermedad, por lo que pueden considerarse como biomarcadores [9].

Existen numerosas técnicas para la detección de autoanticuerpos descritas a través de los años, como son los métodos inmunoquímicos para la presencia o ausencia de autoanticuerpos, y los métodos inmunométricos para la cuantificación de autoanticuerpos, como son la inmunofluorescencia, la fijación del complemento, la aglutinación pasiva, la inmunodifusión, la contraelectroforesis, la inmunoprecipitación, el inmunoblot y el inmunodot [10]. En el continuo intento por mejorar la calidad analítica, la sensibilidad y la especificidad de las pruebas, se han creado varias técnicas que son importantes validar antes de llevar a cabo su aplicación para demostrar su eficacia diagnóstica.

Autoanticuerpos en enfermedades autoinmunes

Los anticuerpos antinucleares (ANA) son inmunoglobulinas que reaccionan contra diferentes antígenos en el núcleo y en el citoplasma de las células, por ello existe controversia sobre si es correcto o no llamarlos anticuerpos antinucleares, a pesar de que también detectan antígenos ubicados en el citoplasma; sin embargo, hasta hoy continúan llamándose con ese nombre. La detección de los ANA se usa como prueba de tamización cuando hay sospecha de una enfermedad de origen autoinmune. Usualmente se utiliza la técnica de inmunofluorescencia indirecta para su detección, y si dan positivos, se recomienda hacer pruebas más específicas para determinar contra cuáles antígenos están dirigidos los autoanticuerpos, y para ello se utilizan pruebas como el ELISA y el inmunoensayo lineal en soporte sólido (LIA). Con estas pruebas se pueden identificar de forma individual los autoanticuerpos dirigidos contra antígenos extractables o ENA, como son el anti-Sm, anti-Ro (SS-A), anti-La (SS-B) y anti-RNP, por nombrar los más conocidos, y se deben también buscar los anticuerpos dirigidos contra el DNA, ya sea por inmunofluorescencia o por ELISA [11].

Anticuerpos contra el DNA: los autoanticuerpos contra el DNA pueden reconocer el DNA de cadena doble (dsDNA) o de cadena simple (ssDNA), dependiendo del tipo de epítipo que se reconozca. El significado diagnóstico de estos dos autoanticuerpos es diferente. Los anticuerpos anti-dsDNA se asocian con lupus eritematoso sistémico; valores altos confirman el diagnóstico de LES, en tanto que niveles bajos se pueden detectar en artritis reumatoide, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Graves, macroglobulinemia de Waldenström, enfermedad mixta del tejido conectivo, esclerosis sistémica, hepatitis autoinmune y síndrome de Sjögren [12, 13]. Un resultado negativo no excluye el diagnóstico de LES porque los anticuerpos anti-dsDNA son positivos en el 50% al 83% de los pacientes con LES [14, 15].

Por su parte, los anticuerpos anti-DNA de cadena simple o ssDNA tienen bajo nivel diagnóstico, se detectan en el suero de pacientes con LES, dermatomiositis y otras enfermedades del tejido conectivo [16, 17]. En niños con síndrome de Sjögren prevalecen estos autoanticuerpos [18].

Anticuerpos anti-histonas: las histonas son proteínas básicas que se unen a la estructura superhelicoidal del DNA. Los autoanticuerpos anti-histonas se presentan en el LES inducido por medicamentos en el 90% de los pacientes [19].

Anticuerpos anti-Sm: los anticuerpos anti-Sm son característicos de LES y usualmente se acompañan de los anti-RNP [20]. Son de gran utilidad para el diagnóstico cuando los anti-dsDNA son negativos.

Anticuerpos anti-Ro (SS-A) y anti-La (SS-B): estos anticuerpos se asocian usualmente con síndrome de Sjögren. Más del 90% de los sueros con anticuerpos anti-Ro (SS-A) también son positivos para anticuerpos anti-La (SS-B) [21-24]. La principal indicación clínica para la detección de anticuerpos anti-Ro y anti-La es en pacientes cuyos anticuerpos antinucleares (ANA) son negativos y que presentan sintomatología compatible con enfermedad autoinmune. Se encuentran positivos en pacientes con fotosensibilidad, con LES cutáneo, síndrome de Sjögren, LES neonatal y vasculitis [25-30]. Para que estos resultados se consideren positivos por la técnica de ELISA, deben ser dos o tres desviaciones estándar por encima del rango normal.

Anticuerpos anti-RNP (U1RNP): los anticuerpos anti-ribonucleoproteínas o anti-RNP se detectan en prácticamente el 100% de los pacientes con enfermedad mixta del tejido conectivo [24, 31-34], en el 30% de los pacientes con LES, y raramente en pacientes con esclerosis sistémica [27, 35,36]. La presencia de anticuerpos anti-RNP se asocia también con fenómeno de Raynaud, esclerodactilia, dismovilidad esofágica, artritis reumatoide y miositis [37].

Otros autoanticuerpos: los anticuerpos Scl-70 se dirigen contra la topoisomerasa 1, que es una proteína básica de 100 Kd que afecta la estructura terciaria del DNA. Se presentan de manera característica en pacientes con esclerosis sistémica [35, 38-40]. Por su parte, los anticuerpos anti Jo-1 se dirigen contra la enzima histidil-RNAt-sintetasa de 150 Kd y son detectados en un pequeño número de pacientes con dermatomiositis y poliomiositis, y se asocian con daño pulmonar [41-43].

En la **tabla 1** se describen las principales enfermedades asociadas a los diferentes patrones de inmunofluorescencia de los ANA, y los antígenos u organelas blanco contra los cuales están dirigidos.

Tabla 1. Patrón de inmunofluorescencia de los anticuerpos antinucleares, antígeno u organela blanco, y su asociación con enfermedades autoinmunes

Patrón	Antígeno u organela	Enfermedad asociada
Homogéneo o difuso	dsDNA, ssDNA, histonas	Títulos altos son muy sugestivos de LES; títulos bajos son sugestivos de LES o de otra enfermedad del tejido conectivo
Periférico	dsDNA, ssDNA, histonas	Títulos altos son muy sugestivos de LES; títulos bajos son sugestivos de LES o de otra enfermedad del tejido conectivo
Moteado	Sm, RNP, Scl-70, Ro (SS-A), La (SS-B)	Títulos altos son muy sugestivos de LES (anti-Sm), enfermedad mixta del tejido conectivo (anti-RNP), escleroderma (anti-Scl-70), síndrome de Sjögren (anti-SS-A y anti-SS-B); títulos bajos pueden ser sugestivos de otras enfermedades del tejido conectivo
Nucleolar	PM/Scl, fibrilarina (U3-RNP), RNAP I/III, NOR-90 (hUBF)	Títulos altos son prevalentes en escleroderma, fenómeno de Raynaud, LES y síndrome de Sjögren
Centrómerico	Proteína del centrómero	Muy sugestivo de síndrome de CREST, fenómeno de Raynaud, enfermedad mixta del tejido conectivo, telangiectasia
Citoplasmático	Ribosomas, mitocondria, complejo de Golgi, centrosomas, endosomas, Jo-1	Muy sugestivo de dermatomiositis, polimiositis, miositis, LES y síndrome de Sjögren

Pruebas fluorescentes de tamización para anticuerpos antinucleares

Este tipo de pruebas fluorescentes para la detección de autoanticuerpos es el más utilizado, ya que tienen una gran aplicación como pruebas de tamización por su alta sensibilidad, en particular para el diagnóstico de LES. Las pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizan un sustrato (células) rico en material nuclear, y el patrón de fluorescencia puede indicar el tipo de anticuerpos presentes. Cuando un resultado de ANA por inmunofluorescencia indirecta es positivo, se requieren tres parámetros para su análisis: 1) el sustrato utilizado (células de riñón de ratón o hígado de rata, células humanas cultivadas); 2) el título de la prueba; y, 3) el patrón de fluorescencia observado [44-46]. La mayoría de las pruebas usan las células Hep-2 de carcinoma escamoso esofágico disponibles comercialmente [44-46]. El sustrato utilizado para desarrollar la prueba se debe reportar en el resultado. Un suero que es negativo utilizando un sustrato animal se debe probar en un sustrato de células humanas.

Planteamiento del problema

La complejidad de las pruebas de detección de autoanticuerpos ha crecido en las últimas décadas, hasta el punto que es frecuente la generación de confusión y el desconocimiento de cuáles pruebas ordenar, cuándo ordenarlas y cómo interpretar los resultados. Cuando se usan en conjunto con la historia clínica del paciente y el examen físico, la determinación de los autoanticuerpos es de gran utilidad diagnóstica temprana, y en algunos casos, pronóstica y terapéutica.

El objetivo de este trabajo es comparar dos metodologías disponibles para la descripción del perfil de anticuerpos antinucleares y anti-dsDNA, como una aproximación diagnóstica a las enfermedades autoinmunes, utilizando un método inmunométrico de soporte sólido, el inmunoensayo en línea (LIA), y el método tradicional de inmunofluorescencia indirecta, y evaluar su concordancia.

Materiales y métodos

Diseño de investigación: se realizó un estudio de tipo descriptivo, de corte transversal.

Población de estudio: se seleccionaron 72 pacientes consecutivos, con sospecha de enfermedad autoinmune, que consultaron en el Hospital Pablo Tobón Uribe de Medellín (servicios ambulatorios y hospitalización), durante el período comprendido entre diciembre de 2010 y febrero de 2011, independiente del género.

Toma de muestra: se obtuvo sangre periférica por punción venosa de cada uno de los individuos, en tubo sin anticoagulante y con gel de separación. Posteriormente se procedió a la separación del suero por centrifugación para la realización de la prueba.

Técnicas de procesamiento y análisis: Las muestras fueron procesadas de forma paralela por ambos métodos, el inmunoensayo en línea (LIA) y el método tradicional de inmunofluorescencia indirecta, y posteriormente se buscó si había concordancia entre los resultados obtenidos con ambas pruebas.

LIA es un método de inmunoensayo enzimático con antígenos nucleares y citosólicos fijados en membrana de nitrocelulosa para la medición cualitativa de los autoanticuerpos tipo IgG, como ayuda en el diagnóstico de enfermedades del tejido conectivo. Los autoanticuerpos del suero presentes en la muestra se unen a los antígenos y se revela con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano. En la **tabla 2** se describen los autoanticuerpos identificados por el estuche comercial (Human®) de LIA. La prueba es cualitativa y se interpreta según criterios de positividad establecidos por el fabricante, a través de la inspección visual de la tira, la cual es comparada con una tira control de punto de corte procesada en el mismo ensayo.

Tabla 2. Autoanticuerpos identificados por LIA

Antígeno	Característica
Nucleosomas	Nativo
dsDNA	Nativo
Histonas	Nativo
SmD1 (Anti-Sm)	Péptidos sintéticos
U1-snRNP (anti-RNP)	Recombinante
SS-A/Ro60kD (anti-Ro)	Nativo
SS-A/Ro52kD (anti-Ro)	Recombinante
SS-B/La (anti-La)	Recombinante
Scl-70	Recombinante
CENP-B	Recombinante
Jo-1	Recombinante
P0	Recombinante

La detección de los anticuerpos antinucleares mediante inmunofluorescencia utiliza líneas celulares Hep-2. De acuerdo con la fluorescencia observada se describen los patrones. El patrón homogéneo se caracteriza por una tinción homogénea en el núcleo, cuya intensidad puede variar dependiendo de la concentración de los anticuerpos presentes en el suero. El patrón periférico se caracteriza por una tinción regular alrededor del núcleo, en tanto que el centro muestra menos tinción. En el patrón centromérico los núcleos se tiñen con puntos finos distribuidos de manera homogénea en el nucleoplasma de las células, mientras que el patrón nucleolar muestra una tinción intensa en los nucleolos. El patrón centriolar se identi-

fica por una tinción intensa de los centriolos de las células en división. Finalmente, el patrón citoplasmático se define como una tinción homogénea que cubre todo el citoplasma [11]. Se considera positiva una prueba de ANA por inmunofluorescencia con un título mayor de 1:160; sin embargo, la sola presencia de ANA positivos no es diagnóstico de enfermedad autoinmune. En general, a mayor título de los ANA, mayor es la probabilidad de una enfermedad reumatológica autoinmune.

Conformación de la base de datos: se construyó una base de datos en Microsoft Office 2003 (programas: Access y Excel) a partir de cada una de las fuentes de información requeridas en este estudio.

Control de inconsistencias de datos: con el fin de controlar posibles errores que afectaran la confiabilidad y validez de la información, se realizó una revisión detallada de la información disponible en la base de datos, con relación a su coherencia, posibles errores e inconsistencias. Después de revisar exhaustivamente los datos, se procedió a realizar la recodificación de las variables que así lo requirieron para el procesamiento de la información.

Programas computacionales para el análisis estadístico: los análisis estadísticos se realizaron con el paquete SPSS (*Statistical Program for Social Science*) versión 14.0 para Windows. Para la realización de las figuras se utilizó el programa Microsoft Excel Office 2007.

Plan de análisis: para cumplir los objetivos planteados en este trabajo, se realizó estadística descriptiva para las variables demográficas, clínicas y determinación de autoanticuerpos.

Consideraciones éticas: según el artículo 11 de la resolución 008430 de 1993, el presente estudio se clasifica como una investigación de bajo riesgo para los participantes, ya que se realizaron intervenciones mínimas que pudieran modificar las variables biológicas y psicológicas de los individuos estudiados, durante la toma de muestras sanguíneas. Por otra parte, se solicitó autorización al Comité de Ética del Hospital Pablo Tobón Uribe para la realización del presente estudio.

En esta investigación se destaca el principio de la beneficencia. El propósito de este estudio a partir de los resultados obtenidos es conocer el comportamiento clínico e inmunológico de los pacientes con enfermedades autoinmunes y la comparación de dos métodos diagnósticos.

En la recolección y procesamiento de la información, se suprimieron los datos de identificación de los pacientes, garantizando de esta manera la confidencialidad y privacidad de la información.

Resultados

De los 72 pacientes participantes en el estudio, 58 eran mujeres (80,5%). Los pacientes tenían edades comprendidas entre los 21 y los 85 años, y una edad media de 37,2 años.

La sospecha diagnóstica de los pacientes fue muy variada (ver **tabla 3**), no se encontró una tendencia específica y para algunos pacientes se tenía más de un diagnóstico probable. Los signos y síntomas más comunes fueron eritemosis, petequias, astenia, adinamia, fiebre subjetiva, odinofagia, anuria, celulitis, placas eritematosas, condritis, vómito, ictericia, pérdida de visión, mareos, inapetencia, pérdida de peso, prurito, rigidez matutina, parestesias, edema, disnea, deshidratación, tos productiva, artralgia, cefalea, disminución de la fuerza muscular, cambios de comportamiento, alopecia, insomnio, limitación funcional, brote, fotosensibilidad, visión borrosa, sonofobia, dificultad respiratoria, adenopatías, dolor lumbar, abdominal, articular y ocular. El tiempo de evolución desde la aparición de los síntomas hasta el momento de la consulta fue en promedio de 2 años y 6 meses.

Del total de las 72 muestras analizadas por IFI, se encontró que 37 (51,38%) mostraron fluorescencia para anticuerpos antinucleares. En la **figura 1** se observa la frecuencia de los patrones de ANA detectados por IFI. Los patrones de fluorescencia predominantes en los pacientes estudiados fueron el patrón homogéneo en 17 pacientes (45,94%), el patrón moteado en 11 pacientes (29,72%) y el patrón citoplasmático en 6 pacientes (16,21%); los demás patrones presentaron un comportamiento similar; así, el patrón centromérico y el nucleolar se encontraron en un paciente cada uno (2,7%), y un paciente mostró patrón mixto (moteado y nucleolar).

De las 72 muestras analizadas por LIA, se encontró que 38 (52,7%) eran positivas al menos para un autoanticuerpo. En la **figura 2** se observa la frecuencia de los diferentes anticuerpos detectados por LIA. Los anticuerpos que se detectaron con mayor frecuencia por LIA fueron los anti-nucleosomas en 20 (52,6%) muestras, seguidos de los anti-histonas en 18 (47,36%), los anti-dsDNA en 15 (39,47%), y los anticuerpos anti-SmD1 en 11 (28,94%) muestras. Se encontraron también anti-SSA/Ro52 en 6 (15,78%) muestras, los anti-U1s-nRNP, anti-SSA/Ro60 y anti-SSB/La en 4 (10,52%), los anti-P0 en 3 (7,89%), y los anti-CENP-B y anti-Jo1 en 2 (5,26%) muestras cada uno. La aparición simultánea de los autoanticuerpos fue variada, se presentaron desde un solo autoanticuerpo hasta nueve en una misma muestra; así, en 14 muestras se encontraron anticuerpos para uno solo de los antígenos, en 11 muestras de a dos anticuerpos, en siete muestras se encontraron tres anticuerpos, en cuatro muestras cuatro autoanticuerpos, en una muestra siete anticuerpos y en una muestra se detectaron nueve anticuerpos.

De las 49 muestras positivas por alguno de los dos métodos, se encontró que 26 (53,06%) muestras eran a la vez positivas por ambos métodos, 11 (22,45%) fueron solo positivas por inmunofluorescencia y 12 (24,49%) fueron positivas solo por LIA (ver **figura 3**). Del total de las 72

Tabla 3. Sospecha diagnóstica de los participantes

Sospecha diagnóstica	Número de pacientes
Enfermedad de von Willebrand	1
Nefrotoxicidad	1
Síndrome glomerular	1
Nefritis lúpica clase V activa	1
Síndrome nefrótico	2
Falla renal	2
Polineuropatía	1
Falla hepática	2
Hepatitis autoinmune	2
Trasplante hepático	1
Toxicodemia leve	2
Mialgias	4
Neuritis óptica <i>versus</i> esclerosis múltiple	1
Fiebre recurrente, no especificada	2
Evento vascular subagudo <i>versus</i> patología autoinmune	1
Enteropatía no especificada	1
Fenómeno de Raynaud	2
Derrame articular de rodilla	1
Artritis reumática juvenil en estudio	2
Fibrilación auricular paroxística	1
Hipotiroidismo en tratamiento	2
Osteoartritis	2
Artritis séptica de la rodilla	2
Artritis reumatoide	4
Descartar LES	4
Leucemia linfoblástica aguda (LLA) de precursores T	1
Trombofilia	1
Pancitopenia	1
Mieloma múltiple	1
Esófago de Barrett	1
Dermatitis peribucal	1
Síndrome de Gilbert del injerto	1
Escleromalacia perforante	1
Alopecias andrógenas	1
Dolor articular	2
Sin datos del diagnóstico	18
Otros diagnósticos	44

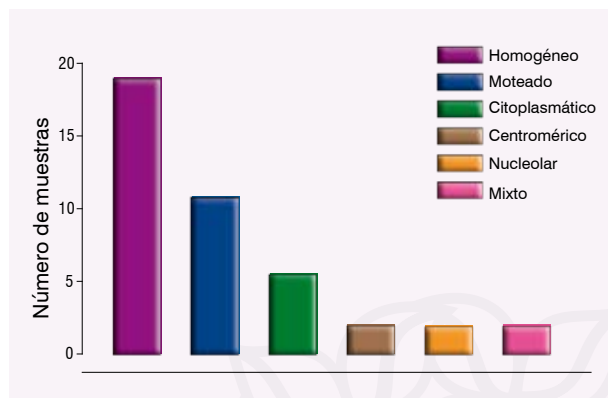


Figura 1. Frecuencia de los anticuerpos identificados por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

muestras analizadas, 23 (31,94%) fueron negativas por ambos métodos. Para calcular el porcentaje de concordancia entre ambos métodos, se tuvieron en cuenta las muestras que dieran por ambos métodos positivas o negativas. Se consideraron discordantes aquellos resultados que eran positivos o negativos por alguna de las pruebas y el resultado era opuesto por la otra. La comparación de la concordancia y la discordancia entre las dos metodologías se observa en la **tabla 4**.

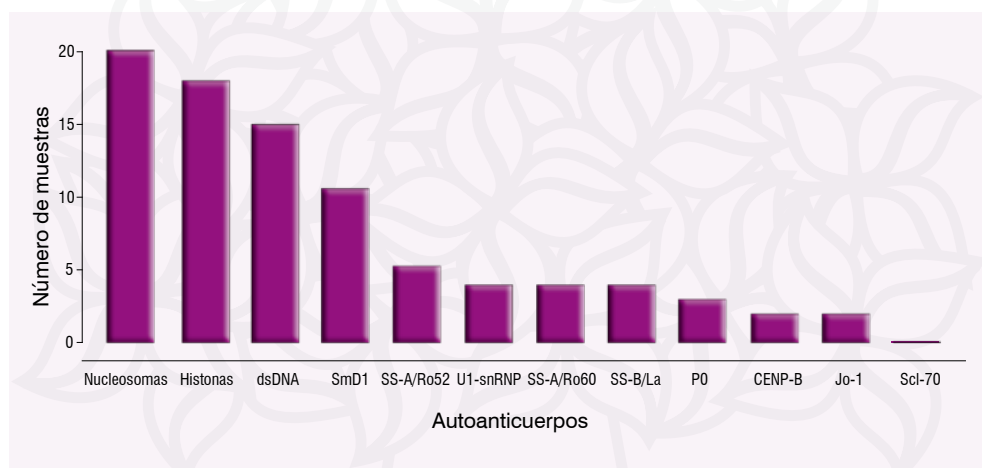


Figura 2. Frecuencia de los anticuerpos identificados por inmunoensayo lineal en soporte sólido (LIA).

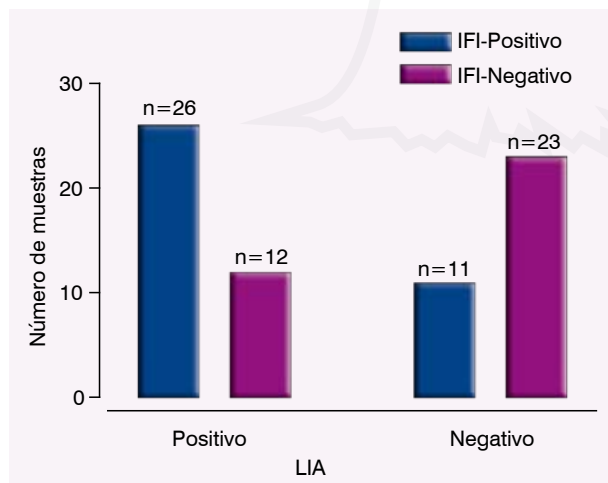


Figura 3. Número de muestras positivas y negativas para anticuerpos antinucleares por ambos métodos.

En la **tabla 5** se observan los datos obtenidos al compararse los resultados entre los patrones observados por IFI y la detección de al menos un anticuerpo por LIA.

Los resultados obtenidos al comparar las muestras positivas para el patrón homogéneo, que fue el más frecuente, con los anticuerpos detectados por LIA se observan en la **figura 4**. En los 17 pacientes con patrón homogéneo por inmunofluorescencia, se encontró que el anticuerpo más frecuentemente hallado por LIA fue el anti-histonas (41,1%),

seguido del anti-nucleosomas y del anti-dsDNA con 29,4% cada uno.

En la **figura 5** se muestra la comparación entre el patrón moteado de fluorescencia con los resultados obtenidos por LIA.

En los 11 pacientes con patrón moteado por inmunofluorescencia, se encontró que el anticuerpo más frecuentemente hallado por LIA fue el anti-nucleosomas (54,5%), seguido del anti-histonas (45,4%) y del anti-Sm (36,3%).

Tabla 4. Porcentaje de concordancia y discordancia entre ambas pruebas para la detección de autoanticuerpos

Autoanticuerpos	Muestras (total n=72)	%
% Concordancia	49	68,05
% Discordancia	23	31,94

Tabla 5. Comparación de los resultados entre los patrones observados por IFI y la detección de al menos un anticuerpo por LIA

Patrón observado por IFI	Muestras positivas por IFI	Muestras positivas por LIA en al menos un anticuerpo	Negativas por LIA
Nucleolar	1	0	1
Homogéneo	17	13	4
Moteado	11	8	3
Citoplasmático	6	4	2
Centromérico	1	1	0
Mixto	1	0	1
Total	37	26	11

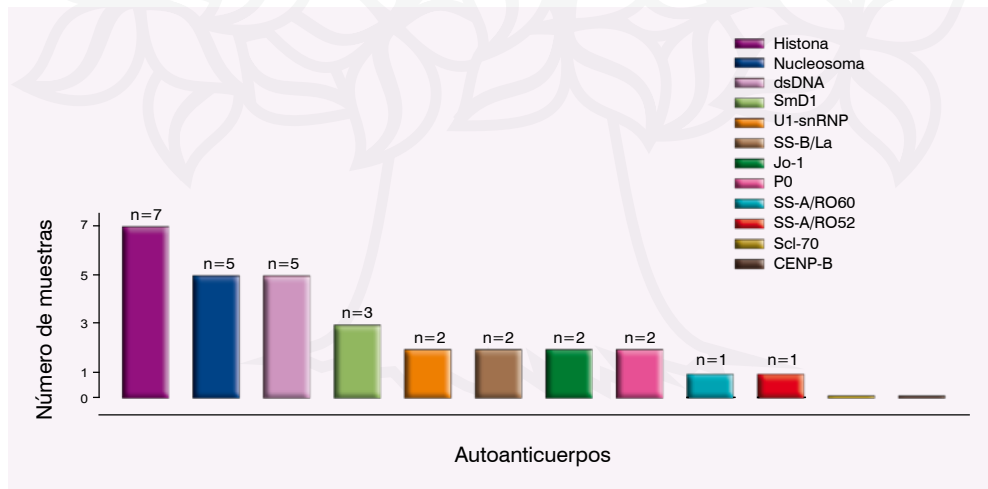


Figura 4. Comparación entre la presencia del patrón homogéneo por fluorescencia y los anticuerpos detectados por LIA.

Discusión

Las enfermedades autoinmunes inflamatorias pueden causar anomalías en los resultados de las pruebas de evaluación inicial por el laboratorio. Los hallazgos característicos pueden incluir por ejemplo, anemia normocítica normocrómica, indicando cronicidad o severidad de la enfermedad; la leucopenia y la trombocitopenia son comunes en pacientes con LES [47, 48]; y en la hepatitis autoinmune se observa un incremento en los niveles de las tran-

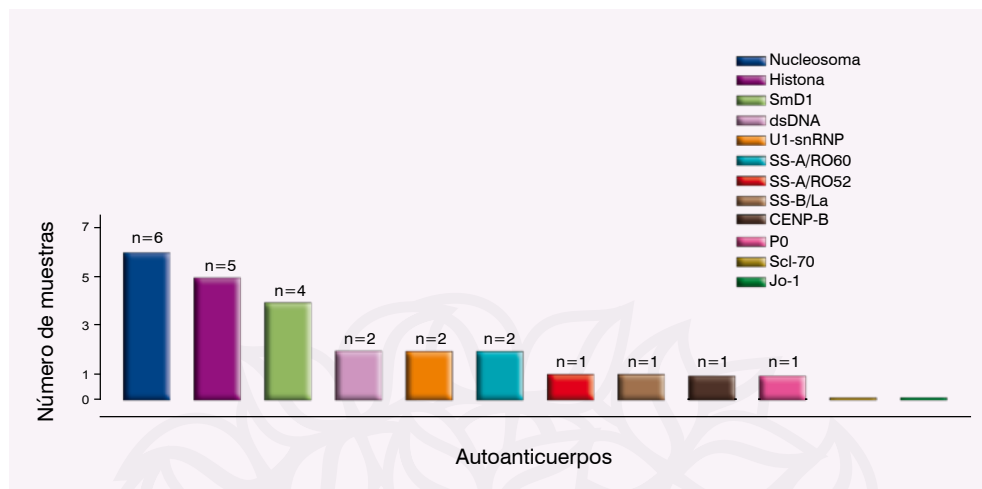


Figura 5. Comparación entre la presencia del patrón moteado por fluorescencia y los anticuerpos detectados por LIA.

saminasas y bilirrubina, aunque estas anomalías también se pueden presentar cuando hay toxicidad por medicamentos [49, 50]. Los estudios de coagulación, tales como el tiempo parcial de tromboplastina, el tiempo de protrombina, o ambos, que no corrigien con las mezclas, sugieren un inhibidor de la coagulación, como se encuentra en el síndrome antifosfolípido [51-53]. La hipercalcemia se puede encontrar en el 30% de los pacientes con sarcoidosis [54]. Un incremento en las enzimas musculares como la creatin kinasa, la alanina transaminasa y la aspartato aminotransferasa puede encontrarse en miopatías inflamatorias autoinmunes como son la dermatomiositis, la polimiositis y la miositis por cuerpos de inclusión [55, 56]. Las proteínas séricas son de gran ayuda para la evaluación de los niveles de inmunoglobulinas. El uroanálisis se usa para evaluar el daño renal (nefritis intersticial y glomerulonefritis) y puede mostrar proteinuria, hematuria o sedimentos activos [57, 58]. Muchas otras enfermedades, tales como la nefropatía diabética, la hipertensión pobremente controlada o las infecciones, pueden tener resultados similares, pero cuando se sospecha una enfermedad autoinmune, estos resultados son alarmas diagnósticas importantes [59, 60].

La presencia de autoanticuerpos en los pacientes no confirma el diagnóstico de enfermedad autoinmune, más que un resultado positivo por serología, es necesaria la compañía de signos y síntomas apropiados que ayudan a apoyar el diagnóstico. Cuando el resultado del estudio inicial para ANA es negativo y no se reúnen los criterios clínicos necesarios para hacer un diagnóstico, se puede descartar la posibilidad de enfermedad autoinmune sistémica. Sin embargo, en algunas enfermedades autoinmunes, como por ejemplo, la artritis reumatoide seronegativa, las formas iniciales de la esclerodermia y la dermatomiositis, pueden cursar con ANA negativos. De igual forma, en algunos pacientes con lupus eritematoso sistémico, los ANA negativos por IFI, pueden estar asociados con manifestaciones clínicas tales como fotosensibilidad, rash cutáneo, bloqueo cardíaco congénito y en general, con una forma más leve de enfermedad sistémica. Si bien en estos pacientes los resultados de los ANA por inmunofluorescencia son persistentemente negativos durante el curso de la enfermedad, el empleo de métodos de laboratorio más sensibles y específicos permite detectar principalmente los anticuerpos anti-Ro (SS-A) y anti-La (SS-B) pertenecientes al grupo anti-ENA (ENA: antígenos nucleares extraíbles) [61, 62]. La detección por el laboratorio de estos anticuerpos en este grupo de pacientes aporta un elemento útil, pues en muchos casos permite acortar el tiempo del diagnóstico y del inicio del tratamiento. Sobre esta base se pueden generar requerimientos para anti-ENA aun en pacientes con resultados negativos de ANA por IFI. Se han utilizado diferentes métodos para

detectar los autoanticuerpos, entre los más utilizados se encuentran los métodos inmunoenzimáticos por ser costo-efectivos [63-66]. Los anticuerpos anti-SSA/Ro y anti-SSB/La son los más frecuentemente detectados por LIA en pacientes con ANA negativos por IFI, destacándose la mayor sensibilidad del LIA con respecto a la IFI para detectar estos anticuerpos.

Los resultados de los autoanticuerpos por inmunofluorescencia se reportan por título y patrón. Los títulos de los anticuerpos antinucleares son usados para hacer diagnóstico, pero no deben usarse como monitoreo de la actividad de la enfermedad. Por lo general, títulos altos representan verdaderos positivos, títulos por encima de 1:160 se consideran positivos y deben requerir otros métodos confirmatorios del diagnóstico. En muchos laboratorios, los títulos de 1:80 o menores son equívocos o inespecíficos; sin embargo, existen excepciones: 1) en niños un resultado de ANA de 1:20 o aun de 1:40 puede ser críticamente importante, y se requieren más estudios; 2) algunos autoantígenos están en baja concentración o son fácilmente eliminados durante el desarrollo de la prueba; y, 3) el punto de corte depende de los laboratorios individuales, de la técnica y del equipo. Un resultado positivo de ANA permite a su vez determinar el blanco intracelular de los anticuerpos. Los patrones más comúnmente reportados son el patrón homogéneo o difuso, el periférico y el moteado [67]. Un patrón de anticuerpos antinucleares específico en individuos sanos puede ser predictivo del desarrollo futuro de la enfermedad [5].

El objetivo principal de este estudio fue determinar la concordancia en la detección de autoanticuerpos antinucleares entre los dos tipos de pruebas (inmunofluorescencia y LIA). De las 72 muestras analizadas por IFI, se encontró que 37 (51,3%) eran positivas para anticuerpos antinucleares, en tanto que 38 (52,7%) eran positivas por LIA al menos para un autoanticuerpo. De las 49 muestras positivas por alguno de los dos métodos, se encontró que 26 (53,06%) muestras eran a la vez positivas por ambos métodos, 11 (22,45%) fueron solo positivas por inmunofluorescencia y 12 (24,49%) fueron positivas solo por LIA (ver **figura 3**). Del total de las 72 muestras analizadas, 23 (31,94%) fueron negativas por ambos métodos. Se encontró una concordancia del 68,06% entre los resultados de ambas pruebas, un valor más bajo que lo reportado en la literatura (90%) [68]; esto podría explicarse porque en todos los estudios donde se comparan las dos metodologías, se incluyeron solo pacientes ANA positivos, por lo tanto la probabilidad de obtener un resultado positivo por LIA es mucho mayor, lo que a su vez tiene como resultado una concordancia de las dos pruebas más alta. Los pacientes incluidos en el presente estudio no fueron seleccionados previamente con una prueba de ANA positiva por IFI, así estos pacientes podrían tener una baja probabilidad pre-test, lo que podría explicar el porcentaje menor de concordancia obtenido en este estudio.

La variabilidad encontrada entre los resultados de las pruebas por inmunofluorescencia y por LIA puede deberse a varios factores, entre ellos: 1) la localización de los antígenos: cuando los antígenos están en el citoplasma, la fluorescencia obtenida por la detección de los anticuerpos antinucleares es baja o ausente, debido a que esta prueba detecta específicamente anticuerpos antinucleares; 2) la naturaleza de los antígenos y anticuerpos empleados en los métodos basados en la reacción antígeno-anticuerpo; 3) el estado inmune del paciente: la declinación de los niveles de anticuerpos en pacientes inmunosuprimidos puede generar falsos negativos; y 4) la densidad de las moléculas: cuando hay una baja densidad de los antígenos nucleares expresados en las células Hep-2, el antígeno puede ser lavado o solubilizado, lo que reduce la sensibilidad para su detección por inmunofluorescencia indirecta.

En los pacientes evaluados, los patrones homogéneo, moteado y citoplasmático fueron los más frecuentemente observados en pacientes con sospecha de enfermedad autoinmune, en tanto que los anticuerpos que prevalecieron fueron los anti-nucleosomas, los anti-histonas y los anti-dsDNA (ver **figuras 1 y 2**).

El patrón homogéneo se asocia usualmente con la presencia de anticuerpos anti-histonas, y de hecho, estos anticuerpos se encontraron en mayor proporción (41,1%) en las muestras con patrón homogéneo positivo, como se observa en la **figura 4**. Sin embargo, el 23,52% de las muestras positivas para este patrón, dieron negativas por LIA (ver **tabla 5**). Se esperaría que las diferencias en los resultados se deban a variaciones en la sensibilidad de las técnicas empleadas en la detección de anticuerpos anti-histonas [12]. Se han descrito anticuerpos naturales de tipo IgM con especificidad anti-histonas que podrían ser detectados por inmunofluorescencia indirecta empleando un conjugado anti-inmunoglobulina humana total y no en aquellos inmunoensayos que emplean conjugados anti-IgG humana, como sucede en este caso con LIA. Así pues, la naturaleza de los antígenos y anticuerpos empleados en los métodos basados en la reacción antígeno-anticuerpo es un factor esencial para comprender y explicar los resultados. Este LIA comercial emplea como antígeno, histonas naturales extraídas y purificadas H1, H2, H3 y H4. Por lo tanto, los diferentes perfiles de anticuerpos anti-histonas presentes en cada paciente serán detectados con sensibilidad variable. También es esperable que sean débilmente detectados algunos anticuerpos anti-histonas que reconocen epítopes conformacionales *in vivo* y que pueden padecer una desnaturalización total o parcial durante el proceso de extracción y purificación.

En el grupo con patrón homogéneo (n=17) se presentaron siete muestras (41,1%) con anticuerpos anti-histonas, y cinco muestras (29,4%) con anti-nucleosoma y anti-dsDNA; además, tres muestras con anti-SmD1, y dos con anti-Ro (SS-A) y anti-La (SS-B). Debido a que los anti-ENA son anticuerpos que se asocian por lo general con un patrón moteado, cabe pensar entonces en la existencia de un patrón moteado enmascarado por el homogéneo y no percibido por el observador. En particular, el antígeno Ro suele solubilizarse o difundir al citoplasma durante el proceso de fijación a las células Hep-2, por lo que la inmunofluorescencia se torna poco sensible para su detección.

En la **tabla 5** se observa que 11 (30,5%) de las muestras tenían patrón moteado, y de éstas, ocho (72,7%) fueron positivas por LIA y tres (27,3%) fueron negativas. En este caso es probable que un fenómeno de mimetismo molecular, la presencia de anticuerpos naturales de tipo IgM y la alteración de algunos epítopes conformacionales, pudieran explicar la existencia de este alto porcentaje de muestras no reactivas por LIA. El patrón moteado suele hallarse en distintas enfermedades sistémicas, como también en síndromes de solapamiento. Se incluyen en este patrón los anticuerpos anti-ENA caracterizados por ser fácilmente extraíbles en solución salina isotónica, y que reconocen a proteínas no histonas unidas a ARN de pequeño tamaño. En el patrón moteado, el anticuerpo más frecuentemente hallado por LIA fue el anti-nucleosoma (54,5%), seguido del anti-histonas (45,4%) y del anti-Sm (36,3%).

Conclusiones

El diagnóstico serológico de las enfermedades del tejido conectivo se basa en la detección de autoanticuerpos contra las proteínas citoplasmáticas y nucleares (ENA). La determinación de los autoanticuerpos específicos apoyan el diagnóstico clínico de las enfermedades del tejido conectivo y el pronóstico de la enfermedad. La determinación de ANA mediante IFI es la principal prueba para la tamización inicial cuando se sospecha de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, la presencia de ANA puede no ser necesariamente de origen autoinmune; es decir, pueden ser anticuerpos naturales o de origen infeccioso. La técnica de IFI es un método de tamizaje útil cuando se complementa con otras metodologías como el ELISA o el LIA, que permiten incluso la detección de autoanticuerpos que no se detectan por IFI. El inmunoensayo lineal en soporte sólido (LIA) detecta un perfil mayor de autoanticuerpos que pueden ser fácilmente detectados, tiene un manejo sencillo, acorta el tiempo del diagnóstico y tiene alta sensibilidad. El LIA es particularmente útil cuando el paciente tiene sintomatología clínica y las pruebas de IFI son negativas.

Los ANA detectados por IFI deben ser evaluados con base al patrón y al título. La detección específica de diversos autoanticuerpos resulta útil en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con enfermedades autoinmunes. Su detección debe realizarse de manera ordenada y razonable, empleando las guías o estrategias enfocadas al buen uso e interpretación de la presencia de autoanticuerpos.

Se conoce la existencia de un subgrupo reducido de pacientes con lupus eritematoso sistémico que resultan persistentemente negativos para los ANA durante el tamizaje por inmunofluorescencia indirecta y, en todos estos casos, el uso de métodos más sensibles permite la detección principalmente de los anticuerpos anti-Ro y anti-La. En esta serie de pacientes, la baja concordancia de los hallazgos pudo ser el resultado de la baja probabilidad pre-test de los pacientes incluidos en este estudio.

Agradecimientos

Proyecto financiado por Comprolab Ltda, casa comercial representante exclusiva de Human® en Colombia.

Bibliografía

- Racanelli V, Prete M, Musaraj G, Dammacco F, Perosa F.** Autoantibodies to intracellular antigens: Generation and pathogenetic role. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 503-508.
- Scofield RH.** Do we need new autoantibodies in lupus? *Arthritis Res Ther* 2010; 12: 120.
- Scofield RH.** Genetics of systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21: 448-453.
- Jaskowski TD, Wilson AR, Hill HR, Branch WD, Tebo AE.** Autoantibodies against phosphatidylserine, prothrombin and phosphatidylserine-prothrombin complex: identical or distinct diagnostic tools for antiphospholipid syndrome? *Clin Chim Acta* 2009; 410: 19-24.
- Stinton LM, Fritzler MJ.** A clinical approach to autoantibody testing in systemic autoimmune rheumatic disorders. *Autoimmun Rev* 2007; 7: 77-84.
- Mohan N, Kerr GS.** ANCA-associated small vessel vasculitis: clinical and therapeutic advances. *Curr Rheumatol Rep* 2010; 12: 406-413.
- Sen D, Rosenstein ED, Kramer N.** ANCA-positive vasculitis associated with simvastatin/ezetimibe: expanding the spectrum of statin-induced autoimmunity? *Int J Rheum Dis* 2010; 13: e29-31.
- Hoffman GS.** What does the future hold for clinical studies in vasculitis? *Clin Exp Immunol* 2011; 164 Suppl 1: 35-38.
- Furie RA, Petri MA, Wallace DJ, Ginzler EM, Merrill JT, Stohl W, et al.** Novel evidence-based systemic lupus erythematosus responder index. *Arthritis Rheum* 2009; 61: 1143-1151.
- Bardin N, Ragot C, Sanmarco M.** Clinical evaluation of a new quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for detection of double-stranded DNA autoantibodies. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1109: 511-518.
- Molina-Restrepo JF.** El laboratorio en las enfermedades reumáticas autoinmunes. *Medicina & Laboratorio* 2007; 13: 11-36.
- Heidari B, Frouzjahi A, Heidari P, Hajian K.** The prevalence and diagnostic performance of anti-cyclic citrullinated peptide antibody in rheumatoid arthritis: the predictive and discriminative ability of serum antibody level in recognizing rheumatoid arthritis. *Ann Saudi Med* 2009; 29: 467-470.
- Dugar M, Cox S, Limaye V, Gordon TP, Roberts-Thomson PJ.** Diagnostic utility of anti-Ro52 detection in systemic autoimmunity. *Postgrad Med J* 2010; 86: 79-82.
- Albon S, Bunn C, Swana G, Karim Y.** Performance of a multiplex assay compared to enzyme and precipitation methods for anti-ENA testing in systemic lupus and systemic sclerosis. *J Immunol Methods* 2011; 365: 126-131.
- Aganovic-Musinovic I, Prljaca-Zececic L, Subasic D.** The incidence of ANA and ETI-dsDNA detected by enzyme immunoassays and indirect immunofluorescence assay (IFA). *Med Arh* 2010; 64: 68-70.
- Mutasim DF.** Lupus erythematosus tumidus as a separate subtype of cutaneous lupus erythematosus. *Br J Dermatol* 2010; 163: 230; author reply 231-232.
- Mutasim DF.** Therapy of autoimmune bullous diseases. *Ther Clin Risk Manag* 2007; 3: 29-40.
- Candon S, Gottenberg JE, Bengoufa D, Chatenoud L, Mariette X.** Quantitative assessment of antibodies to ribonucleoproteins in primary Sjogren syndrome: correlation with B-cell biomarkers and disease activity. *Ann Rheum Dis* 2009; 68: 1208-1212.
- Ghedira I, Landolsi H, Mankai A, Fabien N, Jeddi M.** [Antihistones antibodies in systemic lupus erythematosus, comparison of three assays: Elisa, dot blot and immunoblot]. *Pathol Biol (Paris)* 2006; 54: 148-154.

20. **Doria A, Zen M, Canova M, Bettio S, Bassi N, Nalotto L, et al.** SLE diagnosis and treatment: when early is early. *Autoimmun Rev* 2010; 10: 55-60.
21. **Chien JW, Lin CY.** Autoantibodies to dsDNA, Ro/SSA, and La/SSB in systemic lupus erythematosus. *Adv Clin Chem* 2003; 37: 129-172.
22. **Mavragani CP, Tzioufas AG, Moutsopoulos HM.** Sjogren's syndrome: autoantibodies to cellular antigens. Clinical and molecular aspects. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123: 46-57.
23. **Kim S, Kim JH, Lee JH, Kim HS.** Evaluation of three automated enzyme immunoassays for detection of anti-cyclic citrullinated peptide antibodies in qualitative and quantitative aspects. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 450-457.
24. **Heinlen LD, McClain MT, Ritterhouse LL, Bruner BF, Edgerton CC, Keith MP, et al.** 60 kD Ro and nRNP A frequently initiate human lupus autoimmunity. *PLoS One* 2010; 5: e9599.
25. **Franceschini F, Cavazzana I.** Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies. *Autoimmunity* 2005; 38: 55-63.
26. **Hassan AB, Lundberg IE, Isenberg D, Wahren-Herlenius M.** Serial analysis of Ro/SSA and La/SSB antibody levels and correlation with clinical disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Rheumatol* 2002; 31: 133-139.
27. **Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G, et al.** Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 150-154.
28. **Toker E, Yavuz S, Direskeneli H.** Anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibodies in the tear fluid of patients with Sjogren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 2004; 88: 384-387.
29. **Salomonsson S, Wahren-Herlenius M.** Local production of Ro/SSA and La/SSB autoantibodies in the target organ coincides with high levels of circulating antibodies in sera of patients with Sjogren's syndrome. *Scand J Rheumatol* 2003; 32: 79-82.
30. **Meyer O.** [Anti-SSA/Ro and anti-SSB/La antibodies. What's new?]. *Ann Med Interne (Paris)* 2002; 153: 520-529.
31. **Sato T, Fujii T, Yokoyama T, Fujita Y, Imura Y, Yukawa N, et al.** Anti-U1 RNP antibodies in cerebrospinal fluid are associated with central neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus and mixed connective tissue disease. *Arthritis Rheum* 2010; 62: 3730-3740.
32. **Grossmann K, Roggenbuck D, Schroder C, Conrad K, Schierack P, Sack U.** Multiplex assessment of non-organ-specific autoantibodies with a novel microbead-based immunoassay. *Cytometry A* 2011; 79: 118-125.
33. **Li J, Luo J, Xu W, Zhang XX, Yuan ZL, Shen B.** [Clinical significances of combined detections of autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2010; 39: 390-394.
34. **Li QZ, Karp DR, Quan J, Branch VK, Zhou J, Lian Y, et al.** Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Res Ther* 2011; 13: R38.
35. **Mahler M, Silverman ED, Schulte-Pelkum J, Fritzler MJ.** Anti-Scl-70 (topo-I) antibodies in SLE: Myth or reality? *Autoimmun Rev* 2010; 9: 756-760.
36. **Van Praet JT, Vander Cruyssen B, Bonroy C, Smith V, Delanghe J, De Keyser F.** Validation of a new screening strategy for anti-extractable nuclear antigen antibodies. *Clin Exp Rheumatol* 2009; 27: 971-976.
37. **Massardo L, Suarez-Almazor ME, Cardiel MH, Nava A, Levy RA, Laurindo I, et al.** Management of patients with rheumatoid arthritis in Latin America: a consensus position paper from Pan-American League of Associations of Rheumatology and Grupo Latino Americano De Estudio De Artritis Reumatoide. *J Clin Rheumatol* 2009; 15: 203-210.
38. **Maes L, Blockmans D, Verschueren P, Westhovens R, De Beeck KO, Vermeersch P, et al.** Anti-PM/Sc1-100 and anti-RNA-polymerase III antibodies in scleroderma. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 965-971.
39. **Defendenti C, Spina MF, Castiglione A, Atzeni F, Miadonna A, Saudelli M, et al.** [Alveolar hemorrhage in pulmonary-renal syndrome anti-SCL/70 and anti-MPO-ANCA positive]. *Recenti Prog Med* 2009; 100: 361-364.
40. **Dellavance A, Gallindo C, Soares MG, da Silva NP, Mortara RA, Andrade LE.** Redefining the Scl-70 indirect immunofluorescence pattern: autoantibodies to DNA topoisomerase I yield a specific compound immunofluorescence pattern. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48: 632-637.
41. **Shinjo SK, Levy-Neto M.** Anti-Jo-1 antisynthetase syndrome. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50: 492-500.
42. **Vincze M, Molnar PA, Zilahi E, Kapitany A, Dezso B, Takacs I, et al.** Primary lung adenocarcinoma associated with anti-Jo-1 positive polymyositis. *Joint Bone Spine* 2011; 78: 209-211.
43. **Haussermann A, Gillissen A, Seidel W.** [The anti-Jo-1 syndrome - a specific form of myositis with interstitial lung disease]. *Pneumologie* 2010; 64: 496-503.
44. **Servais G, Karmali R, Guillaume MP, Badot V, Duchateau J, Corazza F.** Anti DNA antibodies are not restricted to a specific pattern of fluorescence on HEp2 cells. *Clin Chem Lab Med* 2009; 47: 543-549.
45. **Satoh M, Vazquez-Del Mercado M, Chan EK.** Clinical interpretation of antinuclear antibody tests in systemic rheumatic diseases. *Mod Rheumatol* 2009; 19: 219-228.
46. **Keefe D, Hess D, Bosco J, Tzartos S, Powell J, Lamsa J, et al.** A rapid, fluorescence-based assay for detecting antigenic modulation of the acetylcholine receptor on human cell lines. *Cytometry B Clin Cytom* 2009; 76: 206-212.
47. **Hepburn AL, Narat S, Mason JC.** The management of peripheral blood cytopenias in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)* 2010; 49: 2243-2254.
48. **Sarkar RN, Banerjee S, Dey S, Saha A, Bhattacharjee P, Banerjee TK, et al.** Haematological presentation of systemic lupus erythematosus. *J Assoc Physicians India* 2009; 57: 767-768.

49. **Fujiwara K, Yasui S, Yokosuka O.** Efforts for making the diagnosis of acute onset autoimmune hepatitis. *Hepatology* 2011.
50. **Mayo MJ.** Management of autoimmune hepatitis. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 224-230.
51. **Chapaeva NN, Trifonova MA, Gromov AA.** [The hemostatic system in patients with antiphospholipid syndrome]. *Klin Lab Diagn* 2010; 51-55.
52. **Anderson JA, Weitz JI.** Hypercoagulable states. *Clin Chest Med* 2010; 31: 659-673.
53. **Tufano A, Guida A, Di Minno MN, Prisco D, Cerbone AM, Di Minno G.** Prevention of venous thromboembolism in medical patients with thrombocytopenia or with platelet dysfunction: a review of the literature. *Semin Thromb Hemost* 2011; 37: 267-274.
54. **Palchevskiy V, Hashemi N, Weigt SS, Xue YY, Derhovanessian A, Keane MP, et al.** Immune response CC chemokines CCL2 and CCL5 are associated with pulmonary sarcoidosis. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 10.
55. **Casciola-Rosen L.** Histidyl-transfer RNA synthetase: a key participant in idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 331-333.
56. **Verschuuren JJ, Palace J, Gilhus NE.** Clinical aspects of myasthenia explained. *Autoimmunity* 2010; 43: 344-352.
57. **Trivedi S, Zang Y, Culpepper S, Rosenbaum E, Fernandez I, Martinez L, et al.** T cell vaccination therapy in an induced model of anti-RNP autoimmune glomerulonephritis. *Clin Immunol* 2010; 137: 281-287.
58. **Murphy ML, Pichichero ME.** Prospective identification and treatment of children with pediatric autoimmune neuropsychiatric disorder associated with group A streptococcal infection (PANDAS). *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156: 356-361.
59. **Flores JC, Alvo M, Borja H, Morales J, Vega J, Zuniga C, et al.** [Clinical guidelines on identification, management and complications of chronic kidney disease]. *Rev Med Chil* 2009; 137: 137-177.
60. **Niang A, Dial C, Ka EF, Leye A, Pouye A, Ka MM, et al.** [Nephrotic syndrom with focal and segmental glomerulosclerosis in Dakar: epidemiological and clinicopathological characteristics (about 134 cases)]. *Dakar Med* 2008; 53: 45-51.
61. **Pourmand N, Blomberg S, Ronnblom L, Karlsson-Parra A, Pettersson I, Wahren-Herlenius M.** Ro 52kD autoantibodies are detected in a subset of ANA-negative sera. *Scand J Rheumatol* 2000; 29: 116-123.
62. **Thomson KF, Murphy A, Goodfield MJ, Misbah SA.** Is it useful to test for antibodies to extractable nuclear antigens in the presence of a negative antinuclear antibody on Hep-2 cells? *J Clin Pathol* 2001; 54: 413.
63. **Toubert ME, Chevret S, Cassinat B, Schlageter MH, Beressi JP, Rain JD.** From guidelines to hospital practice: reducing inappropriate ordering of thyroid hormone and antibody tests. *Eur J Endocrinol* 2000; 142: 605-610.
64. **Ramos Soler D, Mayordomo Aranda E, Calatayud Blas A, Rubio Briones J, Solsona Narbon E, Llobart Bosch A.** [Usefulness of bcl-2 expression as a new basal cell marker in prostatic pathology]. *Actas Urol Esp* 2006; 30: 345-352.
65. **Ramos-Payan R, Aguilar-Medina M, Estrada-Parra S, Gonzalez YMJA, Favila-Castillo L, Monroy-Ostria A, et al.** Quantification of cytokine gene expression using an economical real-time polymerase chain reaction method based on SYBR Green I. *Scand J Immunol* 2003; 57: 439-445.
66. **Phan TG, Ng WW, Bird D, Smithers K, Wong V, Gallagher K, et al.** High-quality, cost-effective strategy for detection of autoantibodies to extractable nuclear antigens. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 471-474.
67. **Skogh T, Dahlgren C, Holmgren K, Peen E, Stendahl O.** Anti-granulocyte antibodies (C-ANCA, P-ANCA, GS-ANA) studied by confocal scanning laser fluorescence microscopy, ELISA, and chemiluminescence techniques. *Scand J Immunol* 1991; 34: 137-145.
68. **Eissfeller P, Sticherling M, Scholz D, Hennig K, Lutich T, Motz M, et al.** Comparison of different test systems for simultaneous autoantibody detection in connective tissue diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1050: 327-339.