



Anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha clínica de enfermedad autoinmune

Antinuclear antibodies in patients with clinical suspicion of autoimmune disease

Santafé-Sarzosa Lorena,* Sáenz-Flor Klever,*[‡]
 Cuero Rocío,[‡] Arévalo Jhoseline*,[§]

Palabras clave:

ANA, automatización, concordancia, prevalencia, antígenos.

Keywords:

ANA, automatization, agreement, prevalence, antigens.

* Synlab Solutions in Diagnostics. Quito-Ecuador.

[‡] Carrera de Medicina. Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Central del Ecuador.

[§] Facultad de Ciencias Químicas-Universidad Central del Ecuador.

Correspondencia:
Kleber Sáenz Flor
 Synlab Solutions in Diagnostics
 Calle A N 31-145 y
 Av. Mariana de Jesús,
 Quito-Ecuador,
 EC170102,
 Telefax: 00593-2-2920911, ext. 331.
E-mail: kleber.saez@netlab.com.ec
 URL: www.synlab-sd.com

Recibido:
 12/02/2019
 Aceptado:
 29/03/2019

RESUMEN

Las enfermedades autoinmunes (EAI) se caracterizan por producir autoanticuerpos contra estructuras del núcleo y citoplasma. La determinación de anticuerpos antinucleares (ANA) se emplea para su cribado. Se estima una incidencia de EAI entre 1-20/100,000 habitantes al año con una prevalencia de 3 al 5% en población general. La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es el método de referencia para la determinación de ANA y establece expresividad y patrón en células HEp-2. Se realizó un estudio epidemiológico transversal para establecer la prevalencia de expresividad de ANA y sus antígenos específicos en 540 muestras de pacientes con sospecha clínica de EAI. Se determinó la expresividad de ANA usando plataforma HELIOS™ y paralelamente IFI no automatizada con lectura por dos observadores entrenados para establecer concordancia entre métodos. Las muestras positivas (HELIOS™) fueron sometidas a detección cualitativa de IgG (17 antígenos ANA) usando ensayo de inmunoblot de membrana. La edad promedio de los pacientes fue de 43.4 ± 16.7 años con predominio del sexo femenino (75.8%). La expresividad de ANA (IFI-HELIOS™) fue de 27.9% ($IC_{95\%}$ 24.1-31.7%), 30.9% en mujeres y 17.24% en hombres ($p < 0.05$).ⁱ El patrón más frecuente fue el moteado fino (35.76%). El 31.8% ($IC_{95\%}$ 24.4-39.2%) de los ANA positivos ($n = 151$) expresaron algún anticuerpo por inmunoblot, siendo el más frecuente el dsADN (25%). La concordancia IFI manual frente a HELIOS™ fue alta (Kappa 0.79). La prevalencia de ANA identificada es comparable a la de otras poblaciones y existe una relación directamente proporcional entre el título de ANA-IFI y la expresividad de antígenos por inmunoblot.

ABSTRACT

Autoimmune diseases are characterized by the production of autoantibodies against own structures of the nucleus and cytoplasm. AID's incidence estimation is between 1-20/100,000 habitants per year, with a prevalence of 3 to 5% in general population. Indirect immunofluorescence (IIF) is the reference method for ANA determination establishing expressiveness and pattern in HEp-2 cells. Antinuclear antibodies (ANA) are used for screening of Autoimmune disease. This study aims to determine the prevalence of expressiveness of ANA and their specific antigens in patients AID's clinical suspicion and the agreement of IFI-ANA automated and IFI-ANA manual. This is a cross-sectional epidemiologic study carried out in 540 samples from patients with clinical suspicion of AID. Patient's average age was 43.4 ± 16.7 years, with a prevalence of female sex (75.8%). An automatic diagnostic platform (HELIOS™) was used to determine the expressiveness of ANA. Simultaneously, two trained observers to establish agreement between methods read IIF manual. Positive samples from automated system were subjected to qualitative detection of IgG (17 antigens ANA) using Immunoblot assay. The expressiveness of ANA-IIF was 27.9% ($CI_{95\%}$ 24.1 - 31.7%), from which 30.9% positive expressiveness were from women and 17.24% in men ($p < 0.05$). The most frequent pattern observed was fine speckled (35.76%). Overall, 31.8% ($IC_{95\%}$ 24.4-39.2%) of the ANA positive patients ($n = 151$) expressed some antibodies by immunoblot, being the most frequent the dsDNA (25%). The agreement between IIF manual and HELIOS™ was high (Kappa 0.79). The identified ANA's prevalence is comparable to other populations. A directly proportional relationship between the titles of ANA-IIF and the expression of antigens by Immunoblot was establish.

ⁱ T de diferencia de proporciones.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades autoinmunes (EAI) tienen una incidencia estimada a nivel mundial de 90/100,000 personas al año y una prevalencia de 3 al 5% en población general.¹⁻⁴ Caracterizadas por pérdida de la tolerancia inmunológica con producción de autoanticuerpos contra estructuras del núcleo y citoplasma celular que provocan daño local o sistémico.^{5,6}

La determinación de anticuerpos antinucleares (ANA) en sustratos de células humanas HEp-2 por (IFI) es el estándar de oro en el cribado diagnóstico de (EAI) establecido por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI),^{7,8} permitiendo identificar inmunoglobulinas de tipo IgG en enfermedades autoinmunes, reumáticas, hepáticas, virales, gástricas y malignas con significancia clínica al relacionarse con la sintomatología del paciente.^{2,3,8-11} Se han establecido prevalencias de expresividad de ANA que oscilan de 1.1-20% en poblaciones seleccionadas (donantes de sangre, personal de salud, entre otros).^{2,10-12}

Si bien la IFI es una técnica altamente sensible 70.96% y específica 85.87%, con un VPP de 77.88% y VPN de 80.85%,¹³ una de sus principales limitaciones es el alto grado de entrenamiento que deben tener los observadores para definir tanto su positividad como los diferentes patrones, estos últimos de particular importancia para uso clínico, por cuánto se asocian con uno u otro tipo de enfermedad autoinmune.^{6,11,14-16}

A lo antes expuesto se suman las condiciones técnicas de montaje del ensayo que pueden generar variaciones en su calidad, por ejemplo, «background» que atentan contra su reproducibilidad tanto intraobservador como interobservador, con concordancias publicadas que oscilan entre la intensidad de fluorescencia ($\kappa = 0.602$) y el reconocimiento del patrón de tinción ($\kappa = 0.627$).^{17,18}

En años recientes se han desarrollado plataformas automatizadas para IFI en busca de mejorar el desempeño de la prueba diagnóstica, disminuyendo los factores de variación asociados a la técnica y empleando sistemas de comparación contra patrones de imagen que apoyen al operador en la definición tanto de positividad como de patrón identificado.^{19,20} La sensibilidad declarada para este tipo de plataformas IFI es de 96.7%, con especificidad de 89.2%²¹ con concordancias públicas intraobservador e interobservador de 90 y 95% entre la interpretación manual y automatizada (κ 0.554-0.69), lo que mejora su desempeño diagnóstico.²¹⁻²³

Sobre la base de lo expuesto, el presente estudio establece la prevalencia de ANA empleando un anali-

zador automatizado de fluorescencia en población con sospecha clínica de (EAI) en muestras remitidas para este propósito a un laboratorio de análisis médicos, así como la definición del patrón de mayor frecuencia y su relación con el anticuerpo específico establecido mediante inmunoblot. Paralelamente, se evaluó la concordancia de hallazgos de la plataforma automatizada frente a la metodología estándar de IFI.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio epidemiológico analítico transversal de punto con la finalidad de establecer la prevalencia de expresividad de anticuerpos antinucleares ANA en 540 muestras remitidas de sujetos con sospecha clínica de enfermedad autoinmune,ⁱⁱ en los meses de julio a septiembre de 2017 en NETLAB S.A., un laboratorio clínico de derivación localizado en Quito-Ecuador. Las muestras fueron seleccionadas con base en muestreo secuencial, eliminándose del mismo aquellas muestras con cualquier grado de ictericia, lipemia o hemólisis.

Una vez seleccionadas, se procedió a ejecutar ensayo automatizado de ANA-IFI empleando plataforma HELIOS™ (AESKU. SYSTEMS)^{21,24} y paralelamente ensayo ANA-IFI no automatizado (Orgentec®)²¹ ambos conforme a protocolo recomendado y validado por fabricante. En ambos casos el *cut-off* empleado fue de 1:80.^{25,26} La IFI no automatizada fue evaluada por dos lectores entrenados en rutina y se calificaron como positivos únicamente aquellos casos en que ambos lectores concordaron en el criterio.

En las muestras calificadas como positivas, se procedió a realizar inmunoblot para la determinación de 17 antígenos específicos (AESKU-DIAGNOSTICS).

La información fue recopilada en una base de datos para posterior limpieza y análisis en SPSS 14.0. Las variables cuantitativas se expresaron en promedio y desviaciones estándar, mientras que las cualitativas en frecuencias simples y porcentajes. La prevalencia de expresividad de ANA se presenta en porcentajes acompañados de sus correspondientes intervalos de confianza al 95%. Para el análisis inferencial se aceptó como válido un nivel de significación de 95% ($\alpha = 0.05$), se empleó T de diferencia de promedios para variables cuantitativas, previa prueba F, y variables

ⁱⁱ Muestra representativa calculada con muestreo aleatorio simple partiendo de una probabilidad esperada de expresividad del 50% a un nivel de significación del 95% y un error de inferencia del 10%.

cualitativas T de diferencia de proporciones. Para el análisis de concordancia entre método automatizado y manual para ANA-IFI se usó repetibilidad compleja y test Kappa de Cohen.²⁷

RESULTADOS

Se estudió un total de 540 muestras de pacientes remitidos con solicitud de anticuerpos antinucleares ANA.

La edad promedio de los pacientes fue de 43.4 ± 16.7 años (rango: 2-94 años), siendo de sexo femenino el 75.8% (n = 424). La edad promedio de las mujeres

fue de 43.1 ± 16.3 años y de los hombres de 44.3 ± 18.1 años ($p > 0.05$).ⁱⁱⁱ

La prevalencia de expresividad de ANA por IFI automatizada fue de 27.9% (IC_{95%} 24.1-31.7%), siendo en las

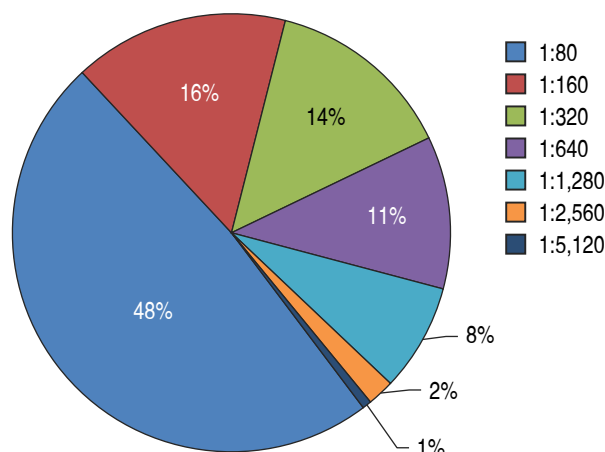


Figura 1. Frecuencia de titulación máxima ANA positivos.

Cuadro I. Prevalencia de expresividad ANA por grupo de edad (ciclo de vida).

Grupos de edad (n)	Prevalencia % (IC _{95%})
Preescolar (6)	50.0 (10-90)
Escolar (7)	28.6 (Nc)
Adolescentes (16)	12.5 (Nc)
Adultos Jóvenes (273)	24.9 (19.8-30)
Adultos (182)	29.7 (23.1-36.3)
Adultos mayores (56)	39.3 (26.5-52.1)

Nc = No calculable.

Cuadro II. Frecuencia de patrones fluorescentes ANA-IFI HELIOS™.

Patrón	n (%)
Moteado fino	56 (37.1)
Moteado fino denso	30 (19.9)
Moteado grueso	20 (13.2)
Patrón mixto	13 (8.6)
Nucleolar homogéneo	10 (6.6)
Homogéneo	6 (4.0)
Citoplasmático mitocondrial	5 (3.3)
Centrómero	3 (2.0)
NUMA1/NUMA2	2 (1.3)
Múltiples puntos nucleares	1 (0.7)
Pocos puntos nucleares	1 (0.7)
Nucleolar punteado	1 (0.7)
Citoplasmático granular fino	1 (0.7)
Citoplasmático granular	1 (0.7)
Aparato de Golgi	1 (0.7)
Total	151 (100.0)

Cuadro III. Frecuencias relativas de expresividad antígenos ANA por inmunoblot por patrón IFI identificado.

Patrón	Frecuencias relativas de expresión por inmunoblot (IC _{95%})
Homogéneo (n = 6)	66.7 (Nc)
Moteado fino denso (n = 30)	33.3 (16.4-50.2)
Centrómero (n = 3)	100 (Nc)
Moteado fino (n = 56)	19.6 (2.2-37)
Moteado grueso (n = 20)	55.0 (33.2-76.8)
Múltiples puntos nucleares (n = 1)	0 (Nc)
Pocos puntos nucleares (n = 1)	0 (Nc)
Nucleolar homogéneo (n = 10)	10 (Nc)
Nucleolar punteado (n = 1)	0 (Nc)
Citoplasmático granular fino (n = 1)	100 (Nc)
Citoplasmático granular (n = 1)	0 (Nc)
Citoplasmático mitocondrial (n = 5)	0 (Nc)
Aparato de Golgi (n = 1)	0 (Nc)
NUMA1/NUMA2 (n = 2)	0 (Nc)
Patrón mixto (n = 13)	38.5 (12-65)

Nc = No calculable.

ⁱⁱⁱ T de diferencia de proporciones.

mujeres de 30.9% (IC_{95%} 22.5-39.3%) y en los hombres de 17.24% (IC_{95%} 13.6-20.8) ($p < 0.05$).

La prevalencia de expresividad de ANA por grupos de edad (ciclo de vida) se describe en el *cuadro I*.

En los patrones identificados en las muestras ANA positivas predominó el moteado fino presente en el 37.1% ($n = 56$) (*cuadro II*).

Entre las muestras positivas (títulos $> 1:80$), la dilución más frecuente fue 1:80, seguida de 1:160 (*figura 1*).

La expresividad de antígenos por inmunoblot en los sujetos ANA positivo por inmunofluorescencia ($n = 151$) fue de 31.8% (IC_{95%} 24.4-39.2%). Las frecuencias de expresividad por tipo de patrón ANA (*cuadro III*).

El anticuerpo más frecuente entre quienes mostraron un inmunoblot positivo ($n = 48$) fue el dsADN, presente en 10.4% de los casos como patrón único. Las frecuencias de expresión de anticuerpos se detallan en la *figura 2*.

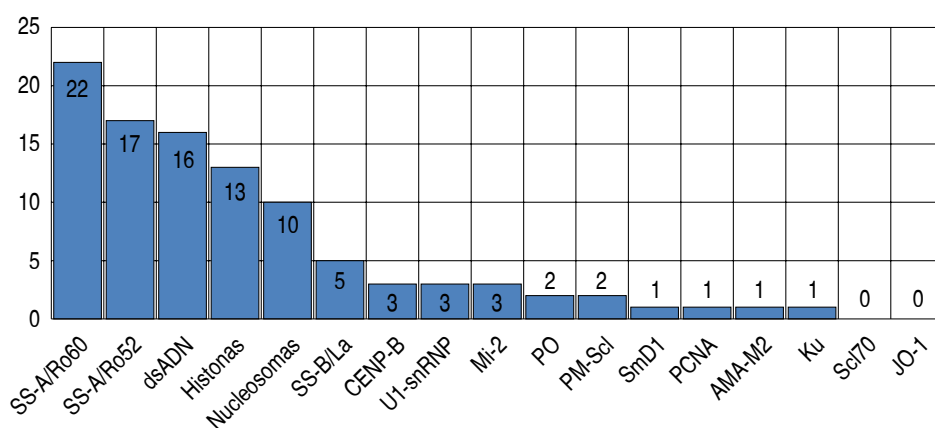


Figura 2.

Frecuencia de expresión de anticuerpos ANA (inmunoblot) sujetos ANA IFI positivos ($n = 151$).

Cuadro IV. Expresividad de antígenos (inmunoblot) por concordancia IFI automatizada (HELIOS™) frente a IFI-tradicional.

IFI auto-matizada (títulos)	Expresividad de antígenos ANA (inmunoblot) n (%)																	Total
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
1:80	1 (9.1)	0	0	0	0	0	3 (27.3)	3 (27.3)	1 (9.1)	0	0	0	0	0	1 (9.1)	1 (9.1)	1 (9.1)	11
1:160	1 (20)	0	0	0	0	1 (20)	3 (60)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5
1:320	4 (28.6)	2 (14.3)	3 (21.4)	0	0	0	2 (14.3)	2 (14.3)	1 (7.1)	0	0	0	0	0	0	0	0	14
1:640	6 (16.2)	5 (13.5)	6 (16.2)	1 (2.7)	1 (2.7)	1 (2.7)	6 (16.2)	5 (13.5)	1 (2.7)	1 (2.7)	0	2 (5.4)	1 (2.7)	0	1 (2.7)	0	0	37
1:1,280	4 (17.4)	3 (13)	4 (17.4)	0	0	0	4 (17.4)	4 (17.4)	1 (4.3)	2 (8.7)	0	0	0	0	0	1 (4.3)	0	23
1:2,560	0	0	0	0	0	0	3 (42.8)	2 (28.6)	0	0	0	1 (14.3)	0	0	0	1 (14.3)	0	7
1:5,120	0	0	0	0	0	0	1 (33.3)	1 (33.3)	1 (33.3)	0	0	0	0	0	0	0	0	3

A = SS-A/Ro60; B = SS-A/Ro52; C = dsADN; D = Histonas; E = Nucleosomas; F = SS-B/La; G = CENP-B; H = U1-snRNP; I = Mi-2; J = PO; K = PM-Scl; L = SmD1; M = PCNA; N = AMA-M2; O = Ku; P = Scl 70; Q = JO-1

Cuadro V. Concordancia IFI automatizada-(HELIOS™) frente a IFI-tradicional.

IFI automatizada	IFI Tradicional n (%)	
	Positivo	Negativo
Positivo	110 (72.9)	41 (27.1)
Negativo	—	389 (100.0)
Total	110 (20.4)	430 (79.6)

La frecuencia de positividad de antígenos por (inmunoblot) por dilución se presenta en el *cuadro IV*.

Al analizar la concordancia entre ANA-IFI automatizada comparada con ANA-IFI, ésta fue de 92.4% (kappa 0.79) (*cuadro V*).

DISCUSIÓN

Las enfermedades autoinmunes son patologías multifactoriales, y sistémicas que provocan daño intrínseco asociado a un defecto del reconocimiento de lo propio, generando lesiones de afectación local o sistémica cuyo diagnóstico es crucial para un adecuado tratamiento, lo que afecta directamente el pronóstico de este tipo de pacientes.^{27,28}

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) desempeña un papel importante en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes y es considerada en la actualidad como el «estándar de oro» con sensibilidades reportadas superiores al 90%.

Una de las limitaciones de la IFI tradicional es la dificultad en su estandarización y la baja concordancia entre observadores.^{9,21-23} Por esta razón, se han desarrollado plataformas automatizadas orientadas a disminuir las variaciones analíticas con sensibilidades de hasta 96.7%.¹⁸

Se estudiaron las muestras provenientes de 540 sujetos con sospecha clínica de patología autoinmune remitidas para análisis de ANA. La media poblacional de la serie estudiada (43.4 ± 16.7 años) está por sobre lo evidenciado en otros estudios, donde habitualmente se encuentra alrededor de los 30 años; esto se debe probablemente a que en la mayoría de estudios se evalúan poblaciones de donantes de sangre.^{2,29}

La prevalencia de expresividad de ANA (IFI-HELIOS™) detectada fue de 27.9% (IC_{95%} 24.1-31.7%), siendo mayor en mujeres (30.9%) que en hombres (17.24%) debido a que las enfermedades autoinmunes en mujeres tienen mayor prevalencia a causa de factores hormonales relacio-

nados con la menopausia, lo que además puede justificar la mayor prevalencia identificada en el grupo de adultos y adultos mayores, en quienes se suma la disminución de la actividad de los linfocitos T reguladores, que conlleva la activación de linfocitos autorreactivos con capacidad de atacar a antígenos propios.^{2,30-32}

La prevalencia encontrada es superior a la reportada en otras poblaciones, donde oscila entre 8.2²⁹ y 10.7%,² con una titulación de corte de 1:40 y 1:80 respectivamente, ya que en el presente estudio se trata de población con sospecha clínica, a diferencia de los estudios analizados en donantes de sangre.^{25,33}

El patrón más frecuente fue el moteado fino (35.76%), el cual está asociado a patologías autoinmunes tipo LES, esclerodermia, Sjögren, entre otras,² seguidas del moteado fino denso (19.9%), que permite discriminar enfermedades reumáticas autoinmunes sistémicas de otros procesos inflamatorios.^{31,34-37}

Al estudiar la expresividad antigénica empleando inmunoblot, 31.8% (IC_{95%} 24.4-39.2%) de los ANA positivo (n = 151) expresaron algún tipo de anticuerpo, siendo el más frecuente el SS-A/Ro60, un antígeno extraíble del núcleo frecuentemente asociado a LES, lupus cutáneo subagudo, dermatomiositis, entre otros; además se expresa habitualmente en patrones fluorescentes tipo moteado fino, el patrón de mayor frecuencia en esta serie de casos.³⁸

Al analizar la concordancia entre la IFI manual frente a la automatizada (HELIOS™), ésta fue, en términos de repetibilidad, compleja de 92.4% y corregida la probabilidad de concordancia por azar, y mostró un índice Kappa de 0.79, lo que confiere una buena concordancia²⁷ similar a la reportada por otros estudios, donde este indicador osciló entre 0.602¹⁷ y 0.984.³⁸

En definitiva, el presente estudio demuestra una elevada concordancia entre la IFI automatizada y el no automatizado; sin embargo, es importante considerar que en 11 casos marcados como negativos para el análisis, se marcaron como tal por discordancia entre los observadores (al menos uno lo identificó como positivo), es decir, una discordancia de 7.3% entre ellos, lo que ratifica la bondad del uso de IFI en plataformas automatizadas al eliminar las potenciales discordancias en la definición de positividad.

Aspectos éticos

El presente estudio respeta las normativas de investigación en sujetos humanos y se realizaron dentro del consentimiento tácito de un procedimiento diagnóstico habitual, preservando la confidencialidad de los participantes.

El soporte brindado por AESKU.GROUP se limitó a la provisión de los reactivos e insumos requeridos, sin que esto haya significado conflicto de intereses en los hallazgos reportados.

Agradecimientos

A AESKU.GROUP y VIBAG por el soporte brindado de reactivos e insumos para la realización del presente estudio.

REFERENCIAS

1. WHO OMS, Environmental health criterio. 236. [En línea]. 2006. [Último acceso: 02 Julio 2017]. Available: <http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc236.pdf?ua=1>.
2. La Rosa FC, Lozano FV. Prevalencia de anticuerpos antinucleares en personas aparentemente sanas. Lima-Perú. *Rev Latinoamer Patol Clin*. 2017; 64 (1): 8-13.
3. Mora OC, Sampértegui DV. Lupus eritematoso sistémico: manifestaciones clínicas y criterios de laboratorio. [En línea]. 2016. [Último acceso: 19 Mayo 2017]. Disponible en: <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/6308/1/12482.pdf>.
4. Anaya JM. ¿Qué son las enfermedades autoinmunes y por qué son importantes? *El Espectador*, p. Sección Salud., 2017.
5. Pérez FO. Prevalencia de las enfermedades autoinmunes en espondiloartropatías seronegativas y viceversa. [En línea]. 2011. [Último acceso: 28 Julio 2017] Disponible en: <http://repository.urosario.edu.co/bitstream/handle/10336/2668/7/185708-2011.pdf?sequence=1..>
6. Fernández MT, Sánchez MC, Junco CR, Denises GG, Iglesias GI. Importancia diagnóstica de los anticuerpos antinucleares. *Revista Cubana de Reumatología*. 2016; 18 (2): 192-195.
7. CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Quality assurance og laboratory test for autoantibodies to nuclear antigens: 1. Indirect Fluorescence Assay for Microscopy and 2. Microtiter Enzyme Immunoassay Methods. Approved Guideline. NCCLS. 2012; 26 (13).
8. Carlos A, Zepeda J. Anticuerpos antinucleares. Una familia diversa. *Revista Médica Hondureña*. 2002; 70 (4): 189-193.
9. Carballo O, Ingenito F, Ginaca A, Carabajal P, Costa M, Balbaryski J. Primer Consenso Argentino para la estandarización de la determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta-HEp-2. *Scielo*. 2012; 46 (1): 3-13.
10. Hayashi N, Koshiba M, Nishimura K, Sugiyama D, Nakamura T, Morinobu S et al. Prevalence of disease-specific antinuclear antibodies in general population: estimates from annual physical examinations of residents of a small town over a 5-year period. *Mod Rheumatol*. 2008; 18 (2): 153-160.
11. Menor AR, Rodríguez GJ, Martín MM, Rodríguez VM, Aranda VC, De la Iglesia SJ. Asociación entre títulos de anticuerpos antinucleares y conectivopatías sistémicas en una Unidad de Reumatología. *Reumatología Clínica*. 2016; 13 (3): 150-155.
12. Carpinelli MM, Giménez V, Ferreira L, Rovira C, Picagüá E, Granados E. Frecuencia de los patrones de anticuerpos antinucleares en pacientes con sospecha clínica de LES. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud* 2010; 8 (2): 27-33.
13. Choque HM, Sosa TL, Paz GM. Determinación de la sensibilidad y especificidad de la prueba de IFI-ANA frente el ensayo inmunoenzimático para antígenos nucleares extractables (perfil ENA). *Scielo*. 2007; 1 (2): 17-22.
14. Hernández RD, Cabiedes J. Immunological techniques that support the diagnosis of the autoimmune diseases. *Reumatol Clin*. 2010; 3: 173-177.
15. Rivero JR. A look to laboratory diagnosis of autoimmune diseases. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*. 2013; 29 (2): 1-17.
16. Robles MA, Ramos CM. Interpretación de resultados. [En línea]. 2005. Disponible en: www.doyma.es/jano.
17. Rigon A, Infantino M, Merone M, Lannello G, Tincani A, Cavazzana I et al. The inter-observer reading variability in anti-nuclear antibodies indirect (ANA) immunofluorescence test: a multicenter evaluation and a review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2017; 16 (12): 1224-1229.
18. Phetsouvanh R, Thojaikong T, Phoumin P, Sibounheuang B, Phommason K et al. Inter-and intra-operator variability in the reading of indirect immunofluorescence assays for the serological diagnosis of scrub typhus and murine typhus. *Am J Trop Med Hyg*. 2013; 88 (5): 932-936.
19. AESKU diagnostics, Inmunofluorescencia Guía, AESKU, 2015.
20. Jörn Voigt, Christopher Krause, Edda Rohwäder et al. Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells. *Clinical and Developmental Immunology*. 2012, Article ID 651058, 1-7.
21. Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassettie D, Pesente F et al. Automated antinuclear immunofluorescence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmun Rev*. 2014; 13 (3): 292-298.
22. Kivity S, Gilburd B, Agmon LN, Garcia CM, Tzafrir Y, Sofer Y et al. A novel automated indirect immunofluorescence autoantibody evaluation. *Clinical Rheumatology*. 2012; 31 (3): 503-509.
23. Bossuyt X, Coorema S, De Baerec H, Verschueren P, Westhovens R, Blockmans D et al. Detection of antinuclear antibodies by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chim Acta*. 2013; 16 (415): 101-6.
24. Meroni P, Bizzaro N, Cavazzana I, Orietta BM, Tincani A. Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. *BMC Medicine*. 2014; 12: 38.
25. Benítez CP, Rincón CO, Quintero J, Aristizábal B. Concordancia entre la determinación de anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia e inmunoensayo lineal. *Medicina & Laboratorio* 2011; 17 (9-10): 429-43.
26. Copple SS, Sawitzke AD, Wilson AM, Tebo AE, Hill HR. Enzyme-linked immunosorbent assay screening then indirect immunofluorescence confirmation of antinuclear antibodies: a statistical analysis. *Am J Clin Pathol*. 2015; 135 (51): 678-84.
27. Viera AJ, Garret M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*. 2005; 37 (5): 360-363.
28. Cabiedes J, Núñez AC. *Reumatología clínica*. [En línea]. 2009. Disponible en: <http://www.elsevier.es>.
29. Ministerio de Salud Pública del Ecuador, Lupus eritematoso sistémico (LES). Guía de Práctica Clínica, Quito: Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2013.
30. Toledo PS, Vivar N. Valores de Referencia de anticuerpos antinucleares en personas aparentemente sana. *Quito-Ecuador. Rev Latinoamer Patol Clin*. 2010; 57 (4): 190-195.
31. Miller FW, Alfredsson L, Costenbader KH, Kamen DL, Nelson LM, Norris JM, De Roos AJ. Epidemiology of environmental exposures in humans autoimmune disease. *Journal of Autoimmunity*. 2012; 39 (4): 259-71.
32. Fairweather D, Rose NR. Women and Autoimmune Diseases. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10 (11): 2005-2011.
33. Brito Fde A, Santos SM, Ferreira GA, Pedrosa W, Gradiisse J, Costa LC et al. Detection of anti-nuclear antibodies by indirect

- immunofluorescence on HEp-2 cells: setting the appropriate screening dilution for the diagnosis of autoimmune rheumatic diseases. *Rev Bras Reumatol*. 2013; 54: 13-20.
34. Jardue AN, González AI. Inmunopatogenia de las enfermedades autoinmunes. *Revista Médica Clínica Condes*. 2012; 23 (4): 464-472.
35. Bentow C, Fritzler MJ, Mummert E, Mahler M. Recognition of the dense fine speckled (DFS) pattern remains challenging: results from an international internet-based survey. *Autoimmun Highlights*. 2016; 7 (8): 1-7.
36. Kang SY, Lee WI. Clinical significance of dense fine speckled pattern in antinuclear antibody test using indirect immunofluorescence method. *Korean J Lab Med*. 2009; 29 (2): 145-51.
37. Malyavantham K, Suresh L. Analysis of DFS70 patterns and impact on ANA screening using a novel Hep-2 ELITE/DFS70 knockout substrate. *Autoimmun Highlights*. 2017; 8 (1): 3
38. Bastías C, Sidgman GF, Rodríguez MC. Laboratorio de Inmunología en la Práctica Clínica. *Revista Médica Clínica Condes*. 2015; 26 (6): 712-820.