



2 E. 16. 112

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES
EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO
POR DOS METODOS:
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA Y E. L. I. S. A.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
EZEQUIEL TREJO GOMEZ**

MEXICO, D. F.

1984



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Contenido	página
Capítulo	
Introducción.....	1
Generalidades.....	4
I.- Enfermedades reumáticas.....	5
II.-Anticuerpos antinucleares.....	13
Materiales y métodos.....	27
Cálculos y resultados.....	39
Resumen.....	56
Conclusiones.....	59
Bibliografía.....	64

I N T R O D U C C I O N

INTRODUCCION.

El fenómeno autoinmunidad es una respuesta inmune celular o humoral, dirigida a componentes propios del organismo.

En las enfermedades autoinmunes se han descrito diversos autoanticuerpos dirigidos a órganos, células de la sangre, proteínas séricas y a componentes u organelos celulares.

Los anticuerpos antinucleares son un grupo heterogéneo de inmunoglobulinas con especificidad dirigida a una variedad de constituyentes macromoleculares de núcleos celulares de mamíferos. Se les ha hallado principalmente en el suero de pacientes con enfermedades del tejido conectivo (15).

El significado clínico de los anticuerpos antinucleares fue reconocido por primera vez con el descubrimiento del fenómeno de las células L.E., debido a que se relacionaba con la presencia en el suero de anticuerpos frente a las nucleoproteínas. Anteriormente la determinación de las células L.E. era la única prueba útil en el diagnóstico de lupus eritematoso (17).

Posteriormente los anticuerpos antinucleares fueron reconocidos como inmunoglobulinas características que aparecen en el grupo de padecimientos sistémicos conocidos como - -

enfermedades del tejido conectivo, y entre estas enfermedades se encuentran las siguientes:

El lupus eritematoso sistémico (LES), la esclerosis sistémica progresiva (ESP), la artritis reumatoide (AR), la polimiositis y el síndrome de Sjögren. También se han detectado en pacientes que han recibido ciertas drogas, como la hidralazina, procainamida, isoniazida, sulfonamidas, difenilhidantoína, mefenitoína, trimetadiona, penicilamina, etoxisuccimida, clorpromazina, clortalidona, entre otras (12).

Los anticuerpos antinucleares se demuestran en casi todos los pacientes con lupus eritematoso [90% o más], en muchos casos de esclerosis sistémica progresiva [40-80%], en individuos con artritis reumatoide [29-60%], y en enfermedades del tejido conectivo inducidas por drogas [más del 50%] (12).

Se han empleado numerosas técnicas para la demostración de anticuerpos a toda una variedad de antígenos nucleares, asimismo su especificidad diagnóstica y posible relación en la patogénesis de la enfermedad han sido investigados en los últimos veinte años (14,16).

Existen varios métodos para la determinación de anticuerpos

antinucleares. El método de inmunofluorescencia indirecta ha sido uno de los más utilizados. Otras pruebas que se han utilizado son: Inmunoprecipitación, fijación de complemento, aglutinación pasiva, radioinmunoanálisis e inmunoenzimáticos (6).

Es importante señalar que debido a la diversidad de métodos para la determinación de anticuerpos hacia antígenos específicos de núcleos celulares, y también a los diferentes substratos utilizados, hay algunas variaciones en los resultados obtenidos.

El objetivo principal de este trabajo es realizar una comparación de dos métodos, el de inmunofluorescencia indirecta y el método ELISA, en la determinación de anticuerpos antinucleares en pacientes con lupus eritematoso sistémico.

GENERALIDADES

GENERALIDADES.

I. ENFERMEDADES REUMATICAS.

Las enfermedades del tejido conjuntivo constituyen un grupo variable de padecimientos adquiridos, que parecen tener alteraciones inflamatorias e inmunitarias - diseminadas.

Las enfermedades adquiridas del tejido conjuntivo incluyen por lo general, las siguientes entidades clínicas; artritis reumatoide, lupus eritematoso, polimiositis, esclerosis sistémica progresiva y el síndrome de Sjögren.

Aunque los trastornos del tejido conjuntivo son considerados como enfermedades adquiridas en la mayoría de los enfermos, las causas no han podido ser determinadas y es poco probable que las entidades clínicas ya establecidas tengan causas semejantes. La herencia, infecciones, deficiencias de inmunoglobulinas o el control deficiente de células T, alergia a medicamentos, complejos inmunitarios "antígeno - anticuerpo - complemento", y alguna combinación de todos estos factores, --- parecen desempeñar diferentes papeles, pero se ignora cuales son con exactitud.

Estas enfermedades poseen ciertas características en común, y la diferenciación diagnóstica de ellas a menudo es difícil, debido a que se traslapan en sus propiedades. Las pruebas de laboratorio pueden revelar combinación de resultados inespecíficos, como anemia hemolítica con Coombs positivo, trombocitopenia, leucopenia, alteraciones de las células B y T, excesos o deficiencias de inmunoglobulinas, hipersensibilidad alterada o retardada, anticuerpos antinucleares, anticuerpos anti-DNA, y anti-ENA [antígeno nuclear extraíble], factor reumatoide, crioglobulinas y otras globulinas, pruebas falsas positivas de VDRL, elevación de valores de enzimas musculares, anticuerpos antitiroideos, alteraciones en el complemento del suero y cambios en las proteínas de la fase aguda (8, 17).

- ARTRITIS REUMATOIDE (AR).

la artritis es una enfermedad crónica, generalizada, inflamatoria, de causa desconocida, que afecta principalmente las articulaciones. La enfermedad tiene un amplio aspecto clínico con variabilidad considerable en las manifestaciones articulares y extraarticulares, la enfermedad comienza de manera característica en las pequeñas articulaciones de las manos, y progresa en forma --

centrípeta y simétrica; las deformaciones son comunes. Las manifestaciones extraarticulares incluyen vasculitis, atrofia de la piel y de las masas musculares, nódulos subcutáneos, linfadenopatía, esplenomegalia y leucocitopenia, su frecuencia en la población general es de 1 a 3%, las mujeres superan a los varones en relación 3:1. La edad habitual inicia de los 20 a los 40 años, no obstante, la artritis reumatoide puede empezar a cualquier edad (8, 17).

- ESCLEROSIS SISTEMICA PROGRESIVA (ESP.)

La esclerosis sistémica progresiva es una enfermedad de causa desconocida, que se manifiesta por el depósito excesivamente anormal de colágena en casi todos los órganos del cuerpo. El principio por lo general es insidioso, con edema y luego atrofia de la piel y de las manos. El curso habitualmente tiene un progreso lento, -- crónico e invalidante, pero puede ser rápidamente progresivo y mortal; comunmente empieza en la tercera o cuarta década de la vida. Los niños rara vez son afectados. La frecuencia de la enfermedad es de 4 a 12.5 enfermos por 1'000.000 de individuos, las mujeres son afectadas dos veces más que los hombres y aparentemente no existe predisposición racial alguna (8).

- SINDROME DE SJÖGREN

El síndrome de Sjögren es un padecimiento inflamatorio crónico de causa desconocida, caracterizado por la disminución de la secreción lagrimal y salival, producién dose queratoconjuntivitis seca y xerostomía. Hay rese quedad característica de los ojos, boca, nariz, tráquea, vagina y piel. La mitad de estos enfermos tienen artritis reumatoide y un pequeño porcentaje tienen otras enfermedades del tejido conjuntivo; 90% de los enfermos con el síndrome de Sjögren son mujeres. Aunque el promedio de comienzo de la enfermedad es a la edad de 50 años, el padecimiento ha sido detectado en niños (8).

- LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.

El lupus eritematoso es un trastorno inflamatorio autoinmunitario que puede afectar a múltiples órganos y sistemas. Las manifestaciones generales fueron descritas por primera vez en 1895, antes de ese tiempo, el lupus era considerado como una enfermedad cutánea desfigurante, pero no mortal. Actualmente se sabe que es una enfermedad inflamatoria crónica generalizada que sigue en curso de exacerbaciones y remisiones alternadas. La enfermedad muestra una predilección notoria por las muje-

res [4:1] en edad escolar; no obstante, la edad del comienzo fluctúa entre 2 y 90 años. El trastorno es raro, las cifras recientes de una gran población urbana representativa indican una frecuencia de un enfermo por cada 2,000 personas, este es mayor entre los individuos de raza negra.

Las características inmunológicas principales son:

- a) Fenómeno LE positivo
- b) Título alto de anticuerpos antinucleares
- c) Anticuerpos anti-DNA de una y de doble cadena (DNA-DC y DNA-UC)
- d) Niveles disminuidos de complemento en el suero
- e) Depósito de inmunoglobulinas y complemento a lo largo de la membrana basal glomerular, y en la unión dermoepidérmica (8 , 17).

Los criterios para la clasificación de lupus eritematoso, fueron revisados en 1982 por la ARA "American Rheumatism Association"; La clasificación esta basada en once criterios. En la identificación de un paciente en estudios clínicos, se podrá decir que una persona tiene lupus eritematoso si presenta por lo menos cuatro criterios o más, ya sea en forma seriada o simultánea, duran

te un intervalo de observación. Así tenemos los siguientes 11 [once] criterios (18):

1. ERITEMA MALAR. Eritema fijo, liso o rugoso sobre las mejillas, tendiendo a disminuir en los pliegues nasolabiales.
2. ERITEMA DISCOIDE. Manchas rugosas eritematosas en escamación queratinosa adherente y obturación folicular; puede ocurrir una cicatrización atrófica.
3. FOTOSENSIBILIDAD. Eritema en piel como resultado de una reacción poco común a la luz del sol, por historia del paciente u observación física.
4. ULCERAS ORALES. Ulceración oral o nasofaríngea, generalmente poco dolorosa, observadas por el médico.
5. ARTRITIS. Artritis no erosiva involucrando dos o más articulaciones periféricas, caracterizadas por hipersensibilidad, edema o sinovitis.
6. SEROSITIS.
 - a) Pleuritis. Dolor tipo pleural, frote o evidencia de derrame pleural.
 - b) Pericarditis. Documentada por electrocardiograma, frote o evidencia de derrame pericárdico.

7. ALTERACIONES RENALES.

- a) Persistencia de proteinuria mayor a 0.5 gramos por día o más de 3 + si la cuantificación no se realizó.
- b) Cilindros celulares. Pueden ser células rojas y hemoglobina (cilindros hemáticos), cilindros granulados o una mezcla.

8. ALTERACIONES NEUROLOGICAS.

- a) Ataques convulsivos. En la ausencia de drogas o un trastorno metabólico conocido. Por ejemplo: - Uremia, cetoacidosis, o desequilibrio electrolítico.
- b) Psicosis. En la ausencia de drogas o un trastorno metabólico conocido. Por ejemplo: Uremia, -- cetoacidosis o desequilibrio electrolítico.

9. ALTERACIONES HEMATOLOGICAS.

- a) Anemia hemolítica. Con reticulocitos.
- b) Leucopenia-menor a $4,000/\text{mm}^3$ en forma permanente o en dos o más ocasiones.
- c) Linfopenia-menor a $1,500/\text{mm}^3$ en la ausencia de - drogas inmunosupresoras.

10. ALTERACIONES INMUNOLOGICAS.

- a) Preparación de células L.E. positiva.
- b) Anti-DNA, anticuerpos para DNA nativo a títulos elevados.
- c) Anti-Sm; presencia de anticuerpos para el antígeno nuclear Sm.
- d) Un resultado falso positivo para el examen serológico de sífilis, que se mantiene positivo durante los últimos 6 meses y confirmado por la prueba de inmovilización de Treponema pallidum.

11. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

Títulos anormales de anticuerpos antinucleares, por inmunofluorescencia indirecta o un examen equivalente en la ausencia de ingestión de drogas, que están asociadas con el "lupus inducido por drogas".

II. ANTICUERPOS ANTINUCLEARES.

La historia de los anticuerpos antinucleares, empezó con la descripción de las células L.E. en 1948, por Hargraves y col. Este fenómeno presente en la sangre de pacientes con lupus eritematoso sistémico (ver la figura No. 1), fue la primera evidencia de un anticuerpo que manifestó una reacción con nucleos de células autólogas y también heterólogas (9 , 10). Los leucocitos polimorfonucleares que contienen la masa púrpura homogénea como un cuerpo de inclusión, son llamados células L.E., utilizando la tinción de May-Grunwald-Giemsa en frotis de sangre procesada de pacientes con lupus eritematoso (13).

Aunque esta prueba ha sido utilizada durante muchos años, (una prueba positiva es usada como uno de los criterios para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico), tiene limitaciones, debido a que presenta dificultades técnicas, es cualitativa, y un tanto subjetiva en su interpretación.

Esta prueba detecta principalmente anticuerpos para las nucleoproteínas, es utilizada en muchos laboratorios, pero su utilidad no es discutible. ya que existen pruebas más sensibles y específicas (6).

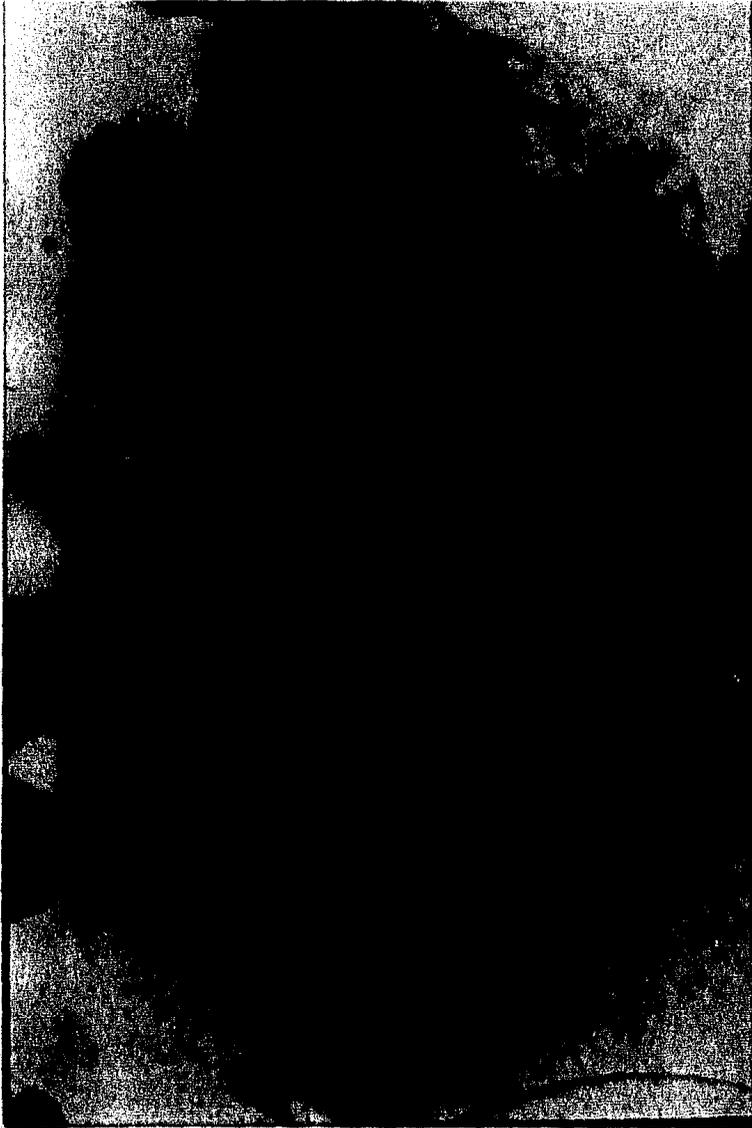


Figura No. 1. CELULAS L.E. (A.R.A.)

Una reacción específica de los anticuerpos antinucleares - con núcleos celulares, fue observada en 1957 por tres grupos de investigadores en forma independiente. Estos investigadores diseñaron un método de fluorescencia indirecta para la evaluación de estos anticuerpos, esta prueba ha sido estandarizada y es utilizada en pacientes en los que se sospecha alguna enfermedad del tejido conectivo (7 , 11).

Este método determina diferentes especies de anticuerpos antinucleares, es muy sensible, por lo que es muy útil cuando los resultados son negativos. Una prueba positiva es compatible con una clasificación de entidades clínicas (incluyendo condiciones benignas secundarias por efecto de drogas) (2).

Estudios realizados sugieren que un título bajo de anticuerpos antinucleares por este método es esencialmente fisiológico, ya que se han determinado en una población sana encontrándose resultados positivos en un 77% de los sueros no diluidos de 466 donadores, con una o más clases de inmunoglobulinas (20).

Las inmunoglobulinas de todas las clases pueden formar anticuerpos antinucleares. No hay correlación alguna entre la clase de inmunoglobulina de los anticuerpos antinuclea-

res, y las manifestaciones clínicas del lupus eritematoso sistémico y otras enfermedades reumáticas. Friou en 1957 (7), introdujo la técnica de inmunofluorescencia indirecta. En esta prueba se han utilizado varios sustratos, como se observa en la tabla No. 1 (5,13); han sido descritos seis patrones morfológicos de tinción inmunofluorescentes, cuatro de los cuales poseen significado clínico (ver la figura No. 2 [8]), que se describen a continuación:

1. PATRON HOMOGENEO O DIFUSO.
2. PATRON DE MEMBRANA O PERIFERICO
3. PATRON MOTEADO.
4. PATRON NUCLEOLAR.

1. PATRON HOMOGENEO (difuso o sólido). Este patrón es observado generalmente con anticuerpos para desoxirribonucleoproteínas, histonas, o complejos de DNA-histonas. Los anticuerpos anti-desoxirribonucleoproteínas, son también los responsables del fenómeno de la célula L.E, es probablemente uno de los más comunes, pero es también el menos específico. Puede ser visto desde un 10 a un 70% en las enfermedades del tejido conectivo, así como en la hepatitis crónica activa (3,8).

2. PATRON PERIFERICO (delineado o afelpado). Este patrón

**CELULAS QUE SE HAN UTILIZADO COMO SUSTRATO
EN LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTINU-
CLEARES POR INMUNOFLORESCENCIA INDIRECTA.**

IMPRESIONES DE BAZO

TIMO DE TERNERA

HIGADO DE RATON O RATA

RIÑON DE RATON O RATA

EPIDERMIS BOVINA Y HUMANA

CELULAS TIROIDEAS

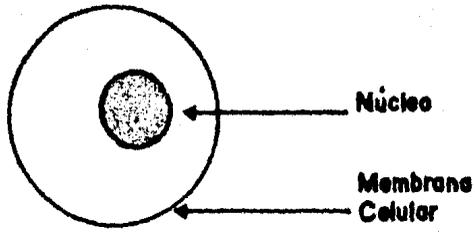
LEUCOCITOS

RIÑON HUMANO

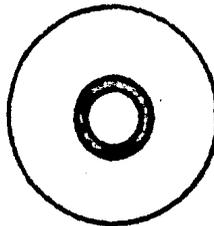
**CELULAS DE CULTIVOS DE LINEAS CELULARES
DE TEJIDOS Y TUMORES,**

CROMOSOMAS HUMANOS EN METAFASE

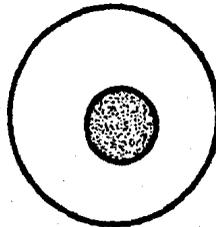
Figura No. 2



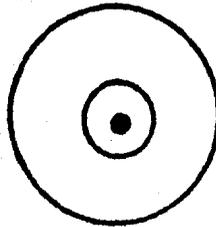
PATRON HOMOGENEEO



PATRON PERIFERICO



PATRON MOTEADO



PATRON NUCLEOLAR

Patrones de tinción inmunofluorescente para los anticuerpos antinucleares .

es producido por los anticuerpos que reaccionan con DNA nativo y complejos de DNA-histonas. Aparentemente puede ser producido también por anticuerpos para desoxirribonucleoproteínas solubles, es visto frecuentemente en pacientes con lupus eritematoso sistémico activo (3).

3. PATRON MOTEADO. Este patrón es atribuido a anticuerpos que reaccionan con antígenos nucleares solubles en solución salina isotónica, y son llamados antígenos extrañables del núcleo (ENA). Actualmente se les ha llamado antígenos nucleares ácidos no histonas, y son subdivididos en varios tipos: Sm, RNP, SS-A, SS-B, MA y otros.

4. PATRON NUCLEOLAR. Este patrón es causado por la tinción homogénea de nucleólos. Se ha sugerido que este antígeno, puede ser el precursor ribosómico de las ribonucleoproteínas de bajo peso molecular, puesto que es sensible a la RNasa. Comúnmente se observa en la esclerosis sistémica progresiva (54%), y con menor frecuencia en el lupus eritematoso (24%), y la artritis reumatoide (9%). Para este patrón, los mejores substratos son los cultivos de líneas celulares por tener nucleólos grandes y numerosos (3,5,8)

Todos los patrones de tinción nuclear, deben ser interpre-

tados cautelosamente por las siguientes razones:

- a) El suero de un paciente con enfermedad del tejido conectivo puede contener muchos autoanticuerpos para diferentes constituyentes nucleares, de manera que un patrón homogéneo puede obscurecer un patrón nucleolar o moteado.
- b) Diferentes anticuerpos pueden hallarse presentes a títulos distintos, de manera que si se diluye el suero, se puede cambiar el patrón observado.
- c) La estabilidad de los diversos antígenos, es diferente y puede ser cambiada mediante la fijación o la desnaturalización.
- d) El patrón observado, parece estar influenciado por los tipos de tejidos o células empleados como substratos en la prueba.

La determinación de anticuerpos antinucleares, ocasionalmente resulta positiva en enfermos con diversas enfermedades crónicas, no obstante, los títulos elevados están asociados frecuentemente con el lupus eritematoso. La ausencia de anticuerpos antinucleares es una evidencia contra el diagnóstico de lupus eritematoso (8). La prevalencia y diferencia en los títulos de los anticuerpos antinucleares, en diversas enfermedades se observa en la tabla No. 2, --

**PREVALENCIA Y TITULOS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN
VARIAS ENFERMEDADES**

ENFERMEDAD	PACIENTES (% POSITIVOS)	TITULOS
LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO		
ACTIVO	98-100	ALTOS (> 1:200)
REMISION	90	MODERADAMENTE ALTOS (1:100-1:200)
LUPUS ERITEMATOSO DISCOIDE	40	MODERADAMENTE BAJOS (1:20-1:100)
ESCLEROSIS SISTEMICA PROGRESIVA.	70	MODERADAMENTE ALTOS
ARTRITIS REUMATOIDE	45	MODERADAMENTE BAJOS
SINDROME DE SJÖGREN	60	MODERADAMENTE ALTOS
ENFERMEDAD MIXTA DEL TEJIDO CONJUNTIVO.	100	MODERADAMENTE ALTOS
ENFERMEDAD DE RAYNAUD	63	MODERADAMENTE ALTOS
POLIARTERITIS	17	BAJOS
POLIMIOSITIS	32	BAJOS

KURT J. BLOCH, MD. JOHN E. SALVAGGIO
JAMA, 248:2734, 1982.

estos anticuerpos pueden aparecer en sujetos sanos, aproximadamente el 35% de personas normales dan un resultado positivo, si su suero es examinado a una dilución menor a -- 1:10, a dilución igual o mayor de 1:10 alrededor del 4% de individuos normales dan resultado positivo. Este fenómeno se acentúa en personas normales mayores de 40 años (3).

Un solo patrón de tinción inmunofluorescente en el método de inmunofluorescencia indirecta, no es diagnóstico de alguna enfermedad específica, y solamente sugiere la presencia de un anticuerpo dirigido a una proteína nuclear específica. Existen varios métodos que pueden ser usados en la determinación de la especificidad de los anticuerpos antinucleares, en la tabla No. 3 se presenta un diagrama recomendado por algunos laboratorios para el seguimiento de las diferentes pruebas. El radioinmunoanálisis usando DNA marcado radioactivamente, es usado para detectar anticuerpos para este antígeno. Un método recientemente desarrollado para detectar anticuerpos para DNA de doble cadena, utiliza el cinetoplasto de un hemoglagelado Crithidia luciliae en un método de inmunofluorescencia indirecta (1), esta prueba puede ser más específica, puesto que el DNA de doble cadena usado in vitro en el radioinmunoanálisis, puede desenrollarse y no ser representativo del DNA de doble

DIAGRAMA EN LA DETERMINACION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

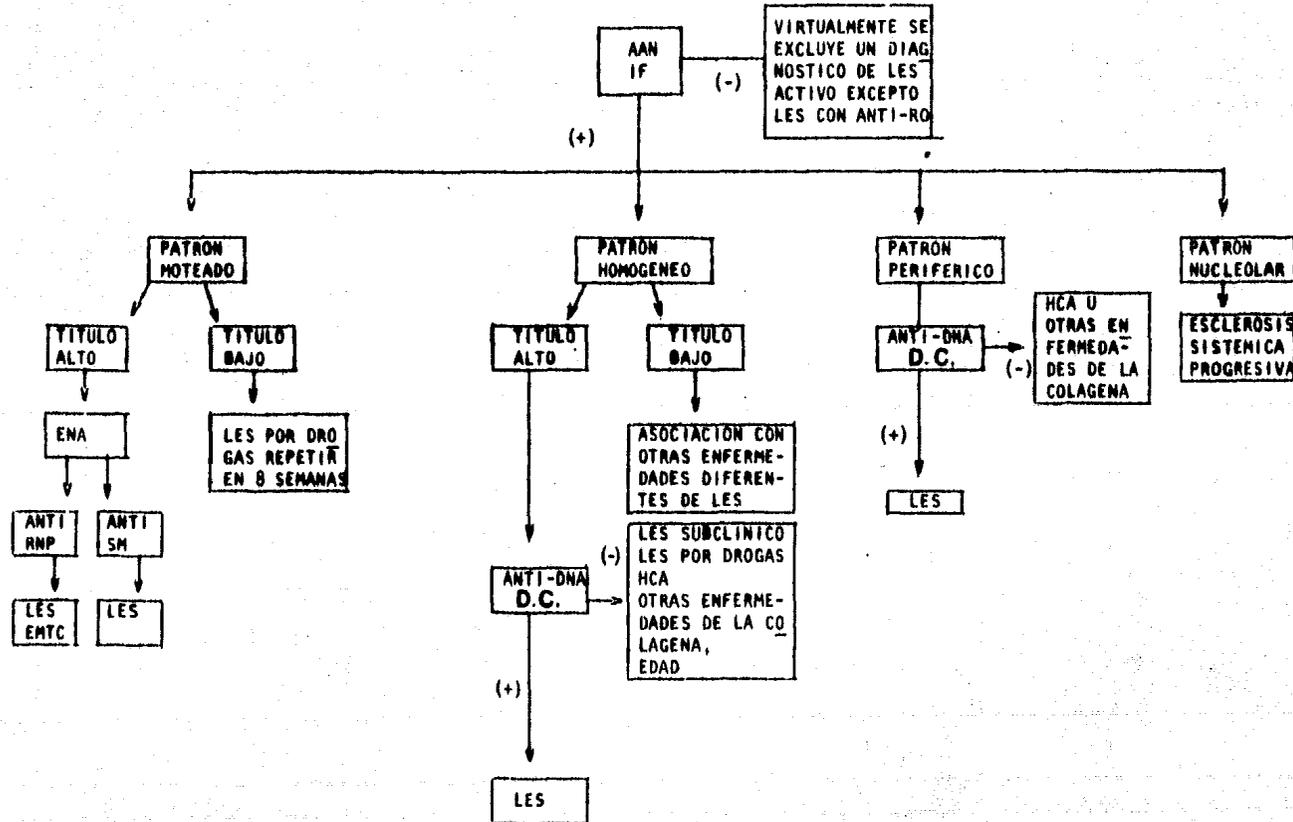


Tabla No. 3

cadena o nativo (3).

Los antígenos nucleares ácidos no histonas se determi-
nan por aglutinación pasiva, inmunodifusión o ambas.

La técnica de inmunodifusión es la más utilizada, y esta prueba utiliza como antígeno una extracción del timo de conejo en una solución salina amortiguadora de fosfatos a un pH de 7.4. El extracto del timo de conejo es colocado en el pozo central de una placa, y el suero del paciente y los sueros que contienen anticuerpos de especificidad de finidad son colocados en los otros pozos. Las líneas de precipitación de identidad entre el suero de especificidad conocida y el suero del paciente, sirven para establecer la identidad del anticuerpo presente en el suero del paciente. (3).

El lupus eritematoso sistémico es el primer ejemplo de una enfermedad autoinmune, y es caracterizado de otras enfermedades por la gran diversidad de anticuerpos antinucleares. Actualmente es posible identificar 8 tipos diferentes de anticuerpos para antígenos nucleares, cada uno de los cuales ocurre en diferente frecuencia. El lupus eritematoso sistémico es caracterizado por la presencia simultánea de más de un anticuerpo antinuclear en el mismo suero, como se observa en la tabla No. 4. En otras enfermedades esta

DIVERSIDAD DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN EL
LUPUS ERITEMATOSO

	FRECUENCIA
DNA NATIVO	50-60%
DNA DESNATURALIZADO (DE UNA SOLA CADENA)	50-61%
HISTONAS	25%
ANTIGENO SM	25-30%
RNP NUCLEAR	40-50%
ANTIGENO SS-A	30-40%
ANTIGENO SS-B	10-15%
PCNA (ANTIGENOS DEL NUCLEO DE CELULAS PROLIFERA TIVAS)	MENOS DE 10%

situación de multiplicidad en el mismo suero, también existe (19).

situación de multiplicidad en el mismo suero, también existe (19).

MATERIAL Y METODOS

1. METODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

1.1 MATERIAL

Tubos de ensayo de 13 x 10 mm.
pipetas volumétricas de 2 y 5 ml.
canastillas para portaobjetos
portaobjetos de 26 x 76 mm.
cubreobjetos de 24 x 50 mm.
cámara húmeda
cajas para tinción de vidrio
criostato
microscopio de luz ultravioleta
matraces aforados de 2 lts.
matraces erlenmeyer de 2 lts.
probetas de 100 y 509 ml.
lápiz diamante
pipetas automáticas de 5, 20 y 100 microlitros.

1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

Sueros de pacientes con diagnóstico de lupus eritemato
so sistémico.
Cortes de hígado de ratón con 4 micras de espesor.

1.3 REACTIVOS

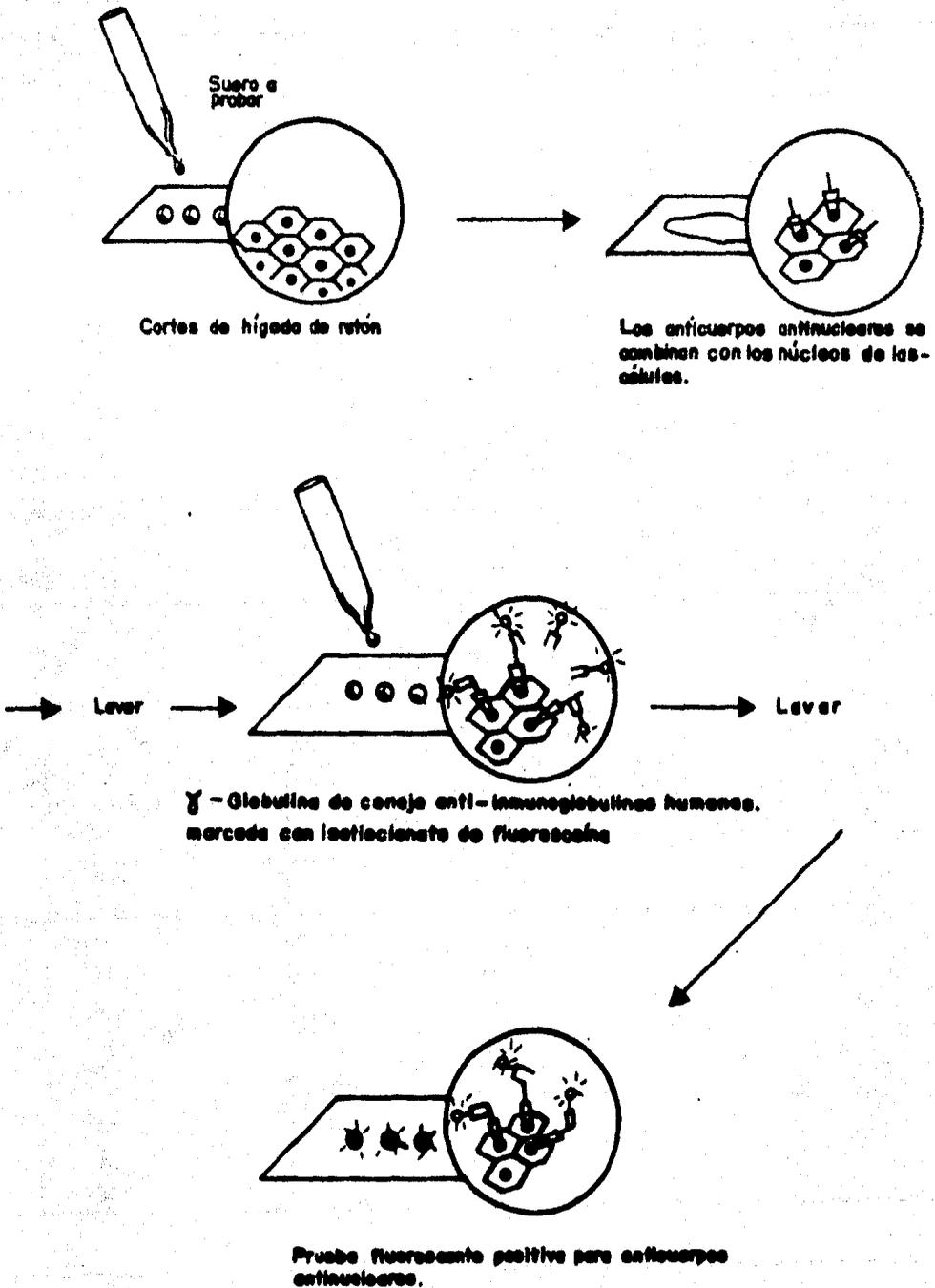
Solución amortiguadora de fosfatos (SAF) (0.01 M)
y NaCl (0.15M, pH 7.3)
Solución de montaje. SAF + glicerina (1:1)

Globulina gamma de conejo anti-inmuno globulinas humanas (polivalente anti-IgG-IgM-IgA) conjugada con isotiociana to de fluoresceína. (Behring Werke AG, Marburg. W. Germa ny. Lote No. 128007c.)
aceite de inmersión.

1.4 FUNDAMENTO

El fundamento de la prueba está esquematizado en la figura No. 3. Este método detecta la presencia de anticuerpos antinucleares en el suero humano, en el sistema se utilizan como antígeno los cortes de hígado de ratón. Cada corte se cubre con una dilución del suero a probar, si existen anticuerpos antinúcleo en el suero, éstos se combinan con los determinantes antigénicos de los núcleos de las células. Después se procede a lavar para eliminar el exceso de suero, enseguida se cubren los cortes con gammaglobulina de conejo anti-humana (polivalente anti-IgG-IgM-IgA) marcada con isotiocianato de fluoresceína. Las inmunoglobulinas anti-humanas marcadas con fluoresceína se unirán en forma específica a las IgG, -IgM e IgA que se combinaron con los determinantes antigénicos. Nuevamente se procede a lavar para eliminar el exceso de gamma globulina anti-humana marcada. A continuación se realiza la lectura en el microscopio de luz ultravioleta, y se observa si existe tinción inmunofluorescente en el tejido.

30
Figura No. 3



Davis, J. S. Antinuclear antibodies. Textbook of Rheumatology. Edited by WN Kelly, ED Harris, S. Ruddy, CB Sledge. Philadelphia WB Saunders. USA. 694. (1980).

1.5 PROCEDIMIENTO

- 1) Se procede a realizar diluciones, 1:16, 1:64 y --- 1:256, de los sueros para probar, en tubos de ensayo limpios, de la siguiente manera: Colocar en tres tubos respectivamente 1.5, 0.3 y 0.3 ml. de SAF, se agrega al primer tubo 0.1 de suero, agitar vigorosamente (dilución 1:16), transferir 0.1 ml. al tubo No. 2, agitar vigorosamente (dilución 1:64), transferir 0.1 ml. al tubo No. 3, agitar vigorosamente (dilución 1:256).
- 2) A cada portaobjetos con los cortes se les adicionan las diluciones del suero, y también los controles positivo y negativo respectivamente.
- 3) Se incuba por 30 minutos en una cámara húmeda a -- temperatura ambiente.
- 4) Los portaobjetos son lavados tres veces con SAF, 10 minutos cada lavado.
- 5) El área periférica al corte se seca con una gasa, cuidando de no tocar el corte.
- 6) El corte es cubierto con la gammaglobulina de -- conejo anti-inmunoglobulinas humanas, conjugada - con isotiocianato de fluoresceína.

- 7) Se incuba por 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente.
- 8) Los portaobjetos son lavados tres veces con SAF, -- 10 minutos cada lavado,
- 9) Se limpia el exceso de la solución de lavado con -- una gasa, se adiciona la solución de montaje y se cubre con un cubreobjetos.
- 10) Los portaobjetos ya preparados son examinados en el microscopio de fluorescencia.

2. METODO ELISA

2.1 MATERIAL

viales de 19 x 48 mm.

pipetas automáticas de 5 y 20 microlitros

puntas para pipetas automáticas

baño con agitación a 37°C.

equipo para lavar los viales

espectrofotómetro

2.2 MATERIAL BIOLÓGICO

suero de pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico.

2.3 REACTIVOS (Cordis Laboratories, Inc. Miami, Florida 33152, USA. Lote No. 10302).

Discos (de un material polimérico no especificado) revestidos con antígeno NP (desoxirribonucleo protefina - de timo de ternero).

Anticuerpos de cabra dirigidos a las inmunoglobulinas humanas IgG e IgM conjugados con fosfatasa alcalina (de ternero). Los anticuerpos están en una solución amortiguadora de TRIS 0.0025 M, albúmina sérica bovina al 0.2%, cloruro de sodio 0.15 M. Como conservador se utiliza azida de sodio al 0.02%.

Diluyente sérico. Cada 50 ml. de esta solución contiene albúmina sérica bovina al 6%. Tween-20 al 0.05% en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M. Como conservador se utiliza la azida de sodio al 0.1%.

Control positivo (humano). Este control tiene títulos elevados de anticuerpos anti-NP (antidesoxirribonucleoprotefina) valorados en U.I./ml (unidades internacionales por mililitro). Obtenido directamente de la OMS (Organización Mundial de la Salud). Este factor antinuclear (homogéneo) fué preparado como referencia en 1970. Se utiliza como conservador azida - de sodio al 0.1%.

Control negativo (humano). Este control no presenta

reacción de anticuerpos para desoxirribonucleoproteína. Se utiliza como conservador azida de sodio al -- 0.1%.

Solución de p-NPP (fosfato de p-nitrofenilato) a una concentración de 1mg/ml en una solución amortiguadora de carbonato de sodio 0.012 M y bicarbonato de sodio - 0.016 M a un pH de 9.8 ± 0.2 . Esta solución contiene cloruro de magnesio 0.001 M.

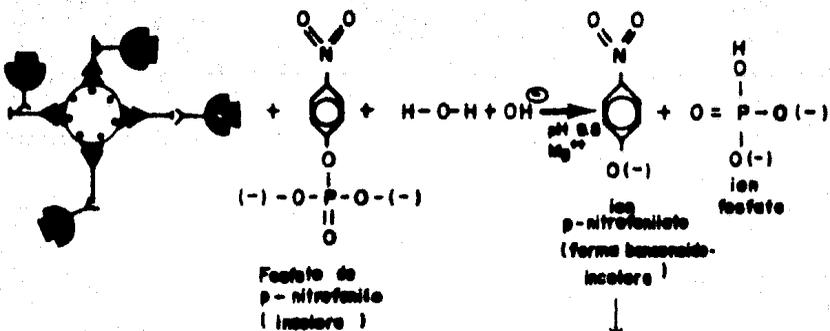
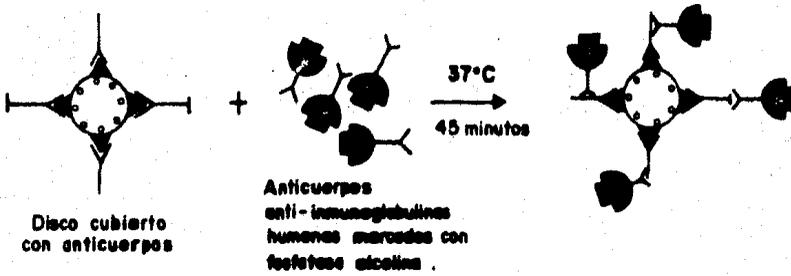
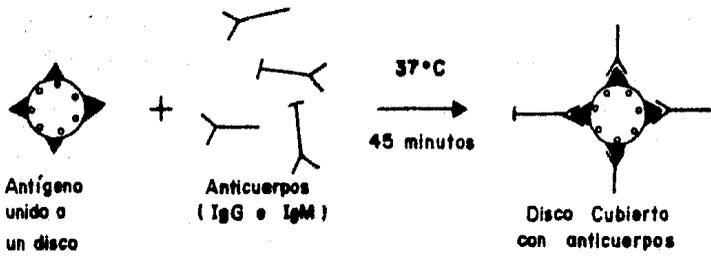
Solución de hidróxido de sodio 3 N.

Solución salina amortiguadora de cloruro de sodio 0.15 M y TRIS (tris-hidroximetil amino-metano) 0.002 M a un pH de 7.2 - 8.0. Para eliminar esta variable, en este trabajo utilizamos esta solución ajustada siempre a un pH de 7.5.

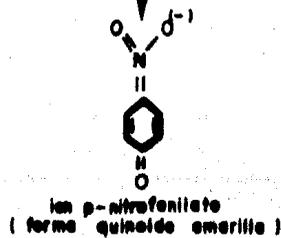
2.4 FUNDAMENTO

El fundamento de esta prueba está esquematizado en la figura No. 4; el antígeno, en este caso desoxirribonucleoproteína, se encuentra acoplado a un disco (polímero). Los sueros diluidos para probar son incubados con los discos impregnados de antígeno, si existen anticuerpos anti-desoxirribonucleoproteína en el suero, éstos se combinan con el antígeno unido al disco. Después de esto, el disco es lavado con el objeto de eliminar el suero residual, y se agregan los anticuerpos para IgG

Figura No. 4



Kochmer, J.F. Enzimas, Tietz, N.W. y cols. QUIMICA CLINICA MODERNA. Ed. Interamericana. México, D.F. 407, (1970)



e IgM humanas marcadas con fosfatasa alcalina. Las inmunoglobulinas anti-humanas marcadas con la enzima se unirán específicamente a las IgG e IgM que se combinaron con el antígeno en la primera reacción. El disco se lava nuevamente para eliminar el exceso de inmunoglobulina marcada, y se incuba con un sustrato incoloro (fosfato de p-nitrofenilato). El sustrato incoloro se hidroliza por la enzima que se encuentra en el "complejo" para formar un producto amarillo --- (ion p-nitrofenilato). La intensidad de color se lee en el espectrofotómetro a 405 nm y es proporcional a la concentración de anticuerpos para desoxirribonucleoproteínas.

2.5 PROCEDIMIENTO

- 1) Hacer diluciones en tubos de ensayo limpios 1:2, 1:4, y 1:8, únicamente del control positivo, colocando en tres tubos 20 microlitros del diluyente sérico; agregar al primer tubo 20 microlitros del control positivo, agitar vigorosamente (dilución 1:2), transferir 20 microlitros al tubo No. 2, agitar vigorosamente (dilución 1:4), transferir 20 microlitros al tubo No. 3, agitar vigorosamente - dilución (1:8).
- 2) Marcar cinco viales para los controles: negativo

positivo y las diluciones respectivas, marcar el número de viales adicionales según la cantidad de sueros problema.

- 3) Colocar en cada vial 0.5 ml. del diluyente sérico. Colocar 5 microlitros de los controles y sueros -- problema.
- 4) Colocar en cada vial un disco revestido con antígeno NP (desoxirribonucleoproteína de timo de ternera).
- 5) Incubar a 37°C durante 45 minutos con agitación con tinua.
- 6) Lavar los viales y discos con la solución salina - amortiguadora (5 veces).
- 7) Adicionar 0.5 ml. de conjugado anti-inmunoglobulinas M y G, marcado con la enzima fosfatasa alcalina.
- 8) Incubar a 37°C durante 45 minutos con agitación con tinua.
- 9) Lavar los viales y discos con la solución salina - amortiguadora (5 veces).

- 10) Transferir los discos por succión a un juego de viales limpios, por duplicado.
- 11) Adicionar 1 ml. de solución del sustrato p-NPP (p-nitrofenil-fosfato).
- 12) Incubar a 37°C durante 20 minutos con agitación continua.
- 13) Adicionar 2 gotas de hidróxido de sodio 3 N.
- 14) Leer inmediatamente a 405 nm. La coloración es estable durante una hora.
- 15) Evaluar e informar los resultados.

CALCULOS Y RESULTADOS

1 CALCULOS

1.1 METODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. En cada preparación se observa:

- a) Si existe coloración inmunofluorescente.
- b) El tipo de patrón de la tinción inmunofluorescente.
Ver la figura No. 5.
- c) Hasta qué dilución existe esta tinción.

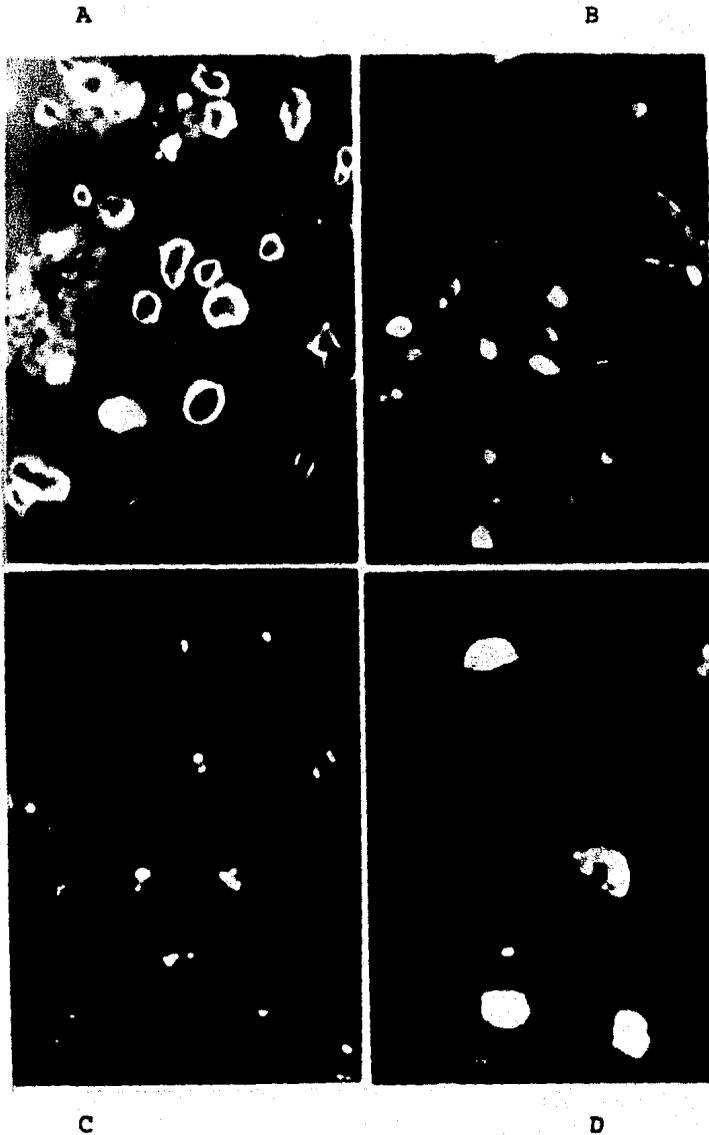


Figura No. 5
PATRONES DE TINCION INMUNOFLORESCENTE PARA
LOS ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (A.R.A.)

A) PATRON PERIFERICO

B) PATRON HOMOGENEO

C) PATRON NUCLEOLAR

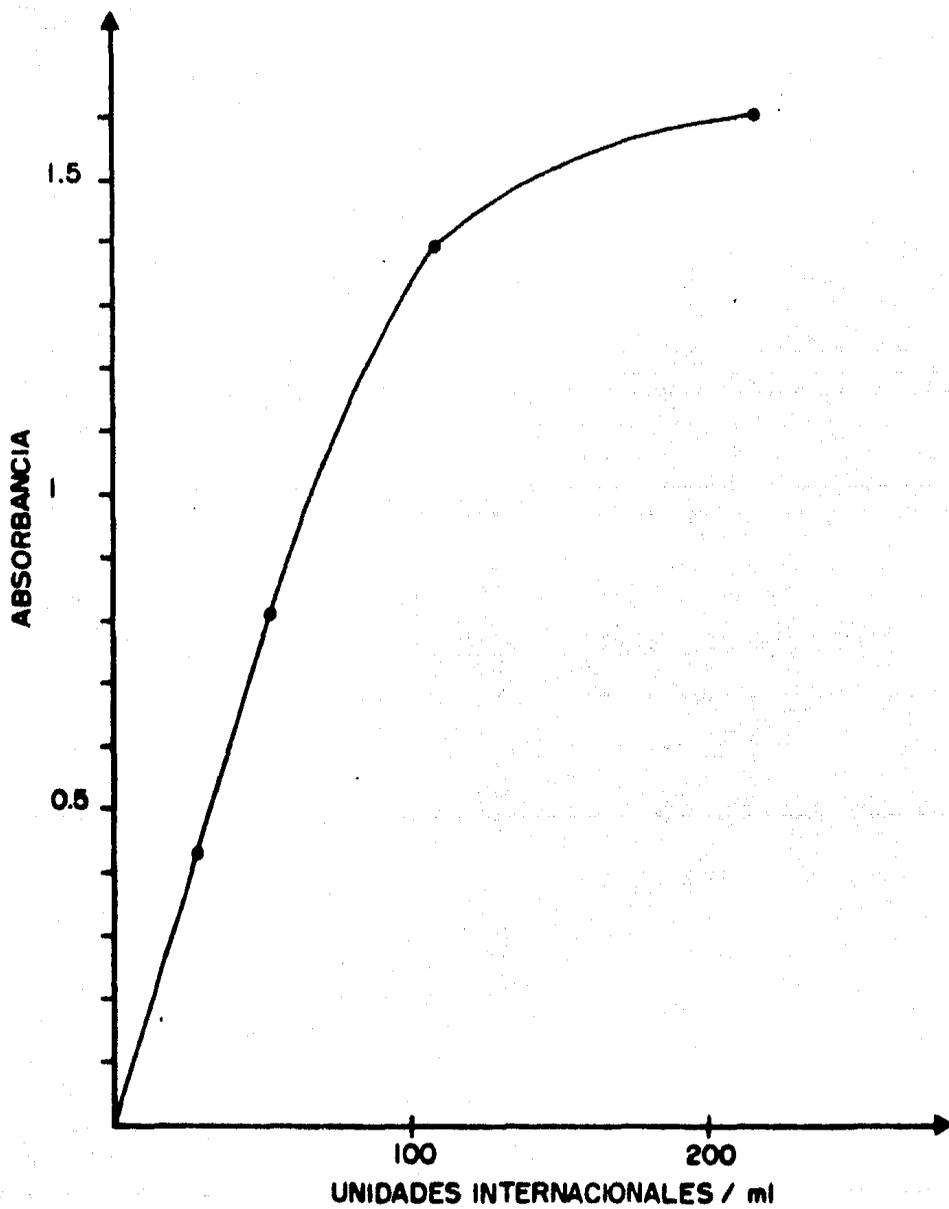
D) PATRON MOTEADO

1.2 METODO ELISA

Se utiliza como patrón un suero con un título de anticuerpos antinucleares de 215 Unidades Internacionales/ml. A partir de este suero se realizan 3 diluciones 1:2, 1:4 y 1:8. Los resultados de absorbancia a 405 nm de cada dilución se grafican con respecto a las U.I./ml. (ver figura No. 6).

U.I./ml	Abs.
26.87	0.43
53.75	0.81
107.5	1.39
215	1.6

**CURVA PATRON DE
ANTICUERPOS ANTINUCLEARES
PARA EL METODO ELISA**



Figuro No. 6

2 RESULTADOS

Valores encontrados de anticuerpos antinucleares por el método de inmunofluorescencia indirecta y ELISA. (Población Mexicana de 18 a 55 años aparentemente sana, ambos sexos).

No.	I.F.	ELISA U.I./ml
1	negativo	18
2	negativo	27
3	* positivo 1:16	10
4	negativo	14
5	* positivo 1:16	15
6	negativo	13
7	negativo	14
8	negativo	8
9	negativo	28
10	negativo	10
11	negativo	33
12	negativo	19
13	negativo	14
14	negativo	39
15	negativo	20
16	negativo	33
17	negativo	11
18	negativo	21
19	negativo	10
20	negativo	27
21	negativo	30
22	negativo	26
23	negativo	8
24	negativo	15
25	negativo	33
26	negativo	12
27	negativo	20
28	negativo	27
29	negativo	19
30	negativo	10

* Patrón homogéneo

VALORES DE REFERENCIA PARA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR EL
METODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA.

V.R. = *NEGATIVO

VALORES DE REFERENCIA PARA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR EL -
METODO DE ELISA

$$\bar{X} = 20.46$$

$$s = 14.3$$

$$V.R. = \bar{X} + 2s = \text{hasta } 49 \text{ U.I./ml}$$

* La literatura señala que hay resultados positivos a diluciones bajas en personas de edad avanzada.

RESULTADOS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES EN PACIENTES CON
DIAGNOSTICO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.

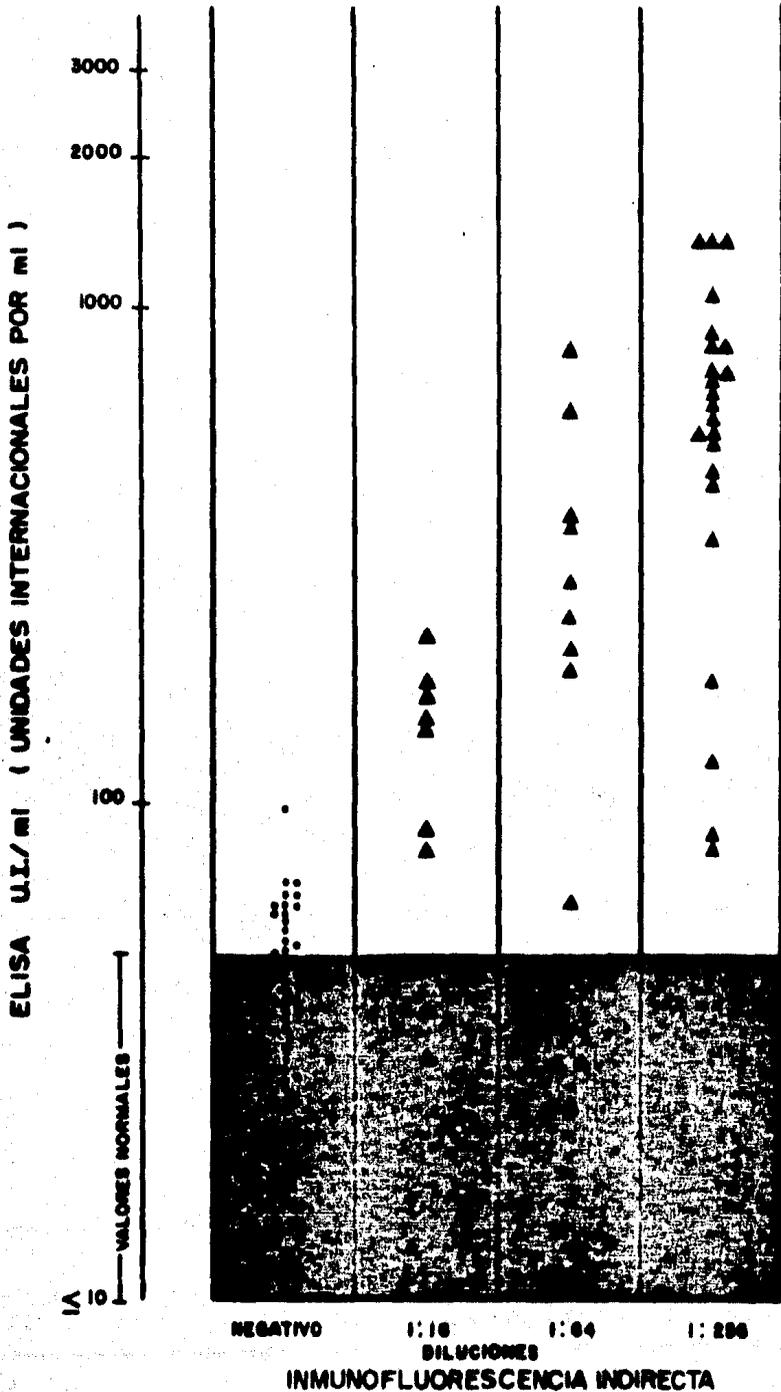
No.	INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA	ELISA U.I./ml.
1	negativo	43
2	negativo	60
3	negativo	65
4	negativo	32
5	negativo	65
6	negativo	56
7	negativo	28
8	negativo	37
9	negativo	17
10	negativo	46
11	negativo	37
12	negativo	46
13	negativo	58
14	negativo	19
15	negativo	43
16	negativo	36
17	negativo	69
18	negativo	97
19	negativo	29
20	negativo	60
21	negativo	38
22	negativo	51
23	negativo	53
24	negativo	28
25	negativo	40
26	negativo	63
27	negativo	40
28	negativo	40
29	negativo	23
30	negativo	44
31	negativo	23
32	negativo	29
33	negativo	19
34	negativo	24
35	negativo	52
36	negativo	50
37	negativo	31
38	negativo	62
39	negativo	70
40	negativo	39

No.	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	ELISA U.I./ml
41	negativo	62
42	negativo	23
43	positivo (homogéneo 1:16)	176
44	positivo (homogéneo 1:16)	140
45	positivo (homogéneo 1:16)	38
46	positivo (homogéneo 1:16)	81
47	positivo (homogéneo 1:16)	144
48	positivo (homogéneo 1:16)	89
49	positivo (homogéneo 1:16)	162
50	positivo (homogéneo 1:16)	31
51	positivo (homogéneo 1:16)	213
52	positivo (homogéneo 1:64)	30
53	positivo (homogéneo 1:64)	381
54	positivo (homogéneo 1:64)	30
55	positivo (homogéneo 1:64)	361
56	positivo (homogéneo 1:64)	602
57	positivo (homogéneo 1:64)	24
58	positivo (homogéneo 1:64)	181
59	positivo (homogéneo 1:64)	812
60	positivo (homogéneo 1:64)	63
61	positivo (homogéneo 1:64)	239
62	positivo (homogéneo 1:64)	371
63	positivo (homogéneo 1:64)	204
64	positivo (homogéneo 1:256)	80
65	positivo (homogéneo 1:256)	616
66	positivo (homogéneo 1:256)	550
67	positivo (homogéneo 1:256)	1311
68	positivo (homogéneo 1:256)	85
69	positivo (homogéneo 1:256)	660
70	positivo (homogéneo 1:256)	1047
71	positivo (homogéneo 1:256)	416
72	positivo (homogéneo 1:256)	588
73	positivo (homogéneo 1:256)	338
74	positivo (homogéneo 1:256)	120
75	positivo (homogéneo 1:256)	1318
76	positivo (homogéneo 1:256)	1320
77	positivo (homogéneo 1:256)	831
78	positivo (homogéneo 1:256)	820
79	positivo (homogéneo 1:256)	426
80	positivo (homogéneo 1:256)	524

NO.	INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	ELISA U.I./ml
81	positivo (homogéneo 1:256)	173
82	positivo (homogéneo 1:256)	870
83	positivo (homogéneo 1:256)	562
84	positivo (homogéneo 1:256)	707
85	positivo (homogéneo 1:256)	724
86	positivo (periférico 1:16)	223
87	positivo (periférico 1:256)	1280
88	positivo (periférico 1:256)	1470
89	positivo (periférico 1:256)	910
90	positivo (moteado 1:16)	30
91	positivo (moteado 1:64)	32
92	positivo (moteado 1:64)	117
93	positivo (moteado 1:64)	25
94	positivo (moteado 1:256)	141
95	positivo (moteado 1:256)	30
96	positivo (moteado 1:256)	24
97	positivo (moteado 1:256)	74
98	positivo (moteado 1:256)	21
99	positivo (moteado 1:256)	15
100	positivo (moteado 1:256)	53
101	positivo (moteado 1:256)	54
102	positivo (moteado 1:256)	50
103	positivo (moteado 1:256)	616
104	positivo (moteado 1:256)	592
105	positivo (moteado 1:256)	47
106	positivo (moteado 1:256)	1047
107	positivo (moteado 1:256)	416
108	positivo (moteado 1:256)	58
109	positivo (moteado 1:256)	54
110	positivo (moteado 1:256)	208

Gráfica No. 1 Comparación entre el patrón homogéneo y ELISA.
PATRON HOMOGENEO

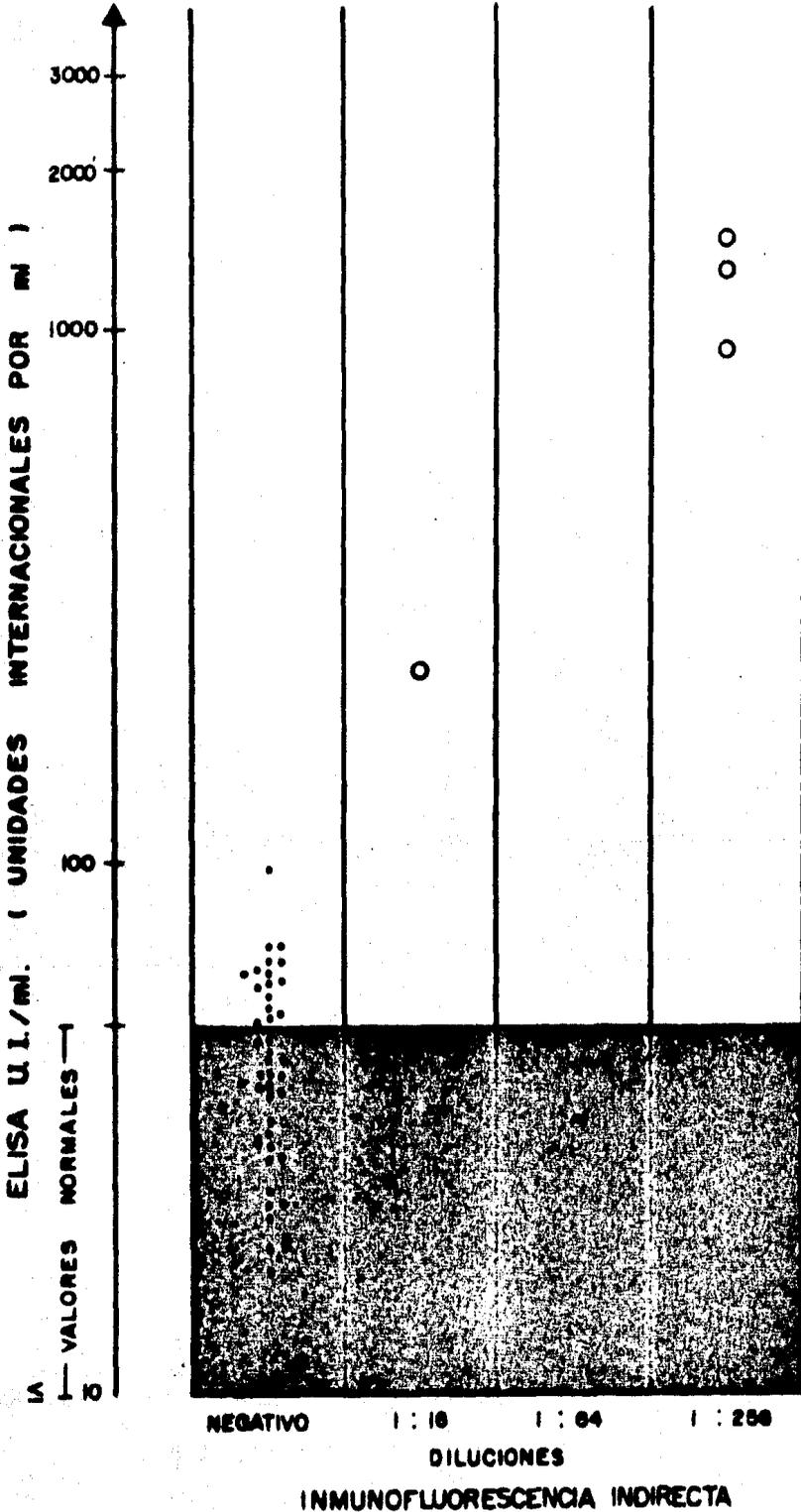
n=85	r=0.51	P<0.01
------	--------	--------



Gráfica No. 2. Comparación entre el patrón periférico y ELISA.

PATRON PERIFERICO

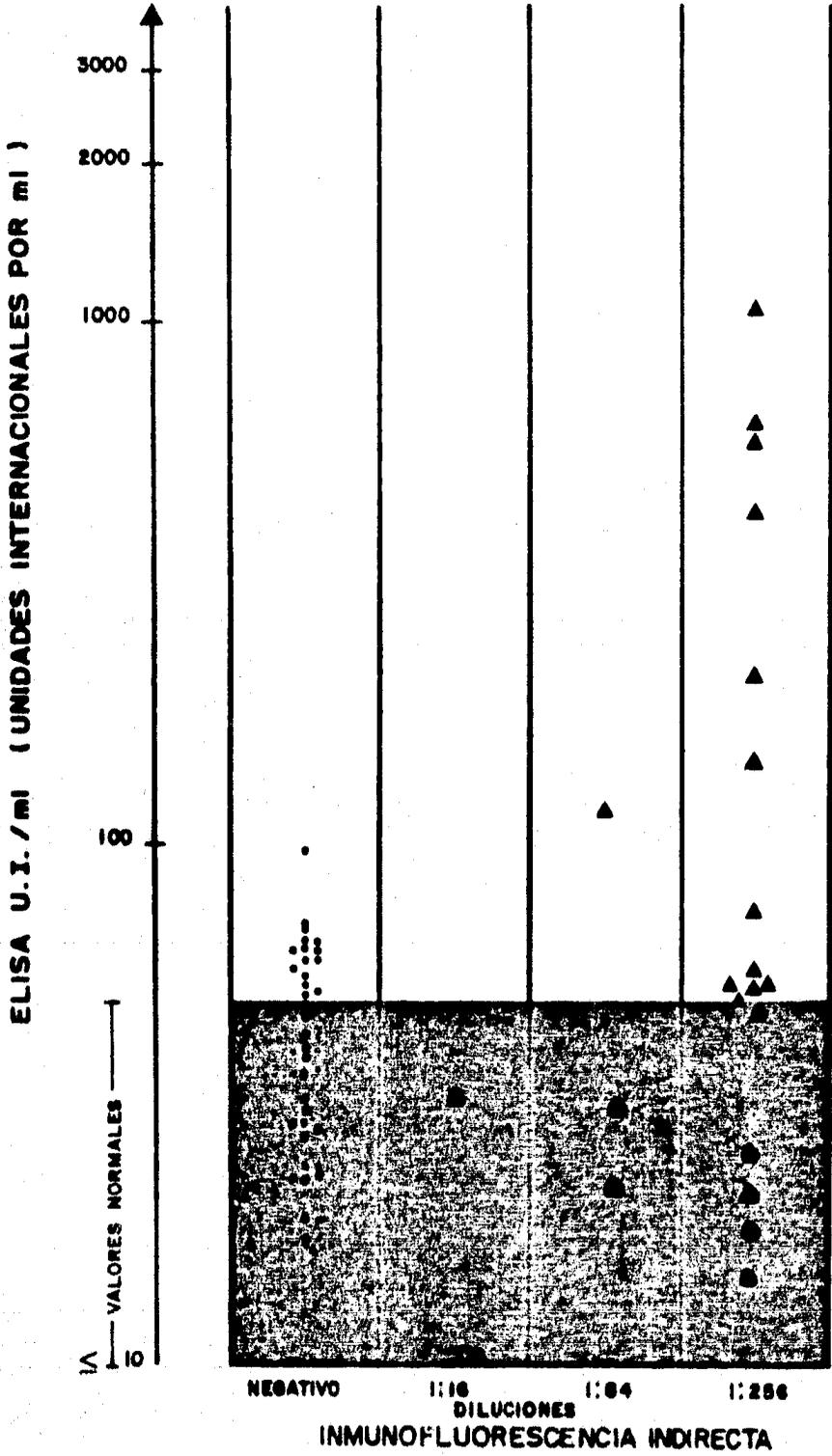
n = 41	r = 0.92	P < 0.01
--------	----------	----------



Gráfica No. 3 Comparación entre el patrón moteado y ELISA.

PATRON MOTEADO

n=63	r=0.17	P>0.05
------	--------	--------



La correlación global entre el método de inmunofluorescencia indirecta y el método ELISA, fué:

$r=0.31$ (n=110) $p < 0.01$

Los factores de correlación entre cada patrón de tinción inmunofluorescente del método de inmunofluorescencia indirecta y ELISA (ver gráficas números 1,2 y 3), fueron:

Patrón homogéneo	y	ELISA	(n=85)	$r=0.51$	$p < 0.01$
Patrón periférico	y	ELISA	(n=41)	$r=0.92$	$p < 0.01$
Patrón moteado	y	ELISA	(n=63)	$r=0.17$	$p > 0.05$

r = factor de correlación obtenido por regresión de mínimos cuadrados con transformación logarítmica de las diluciones.

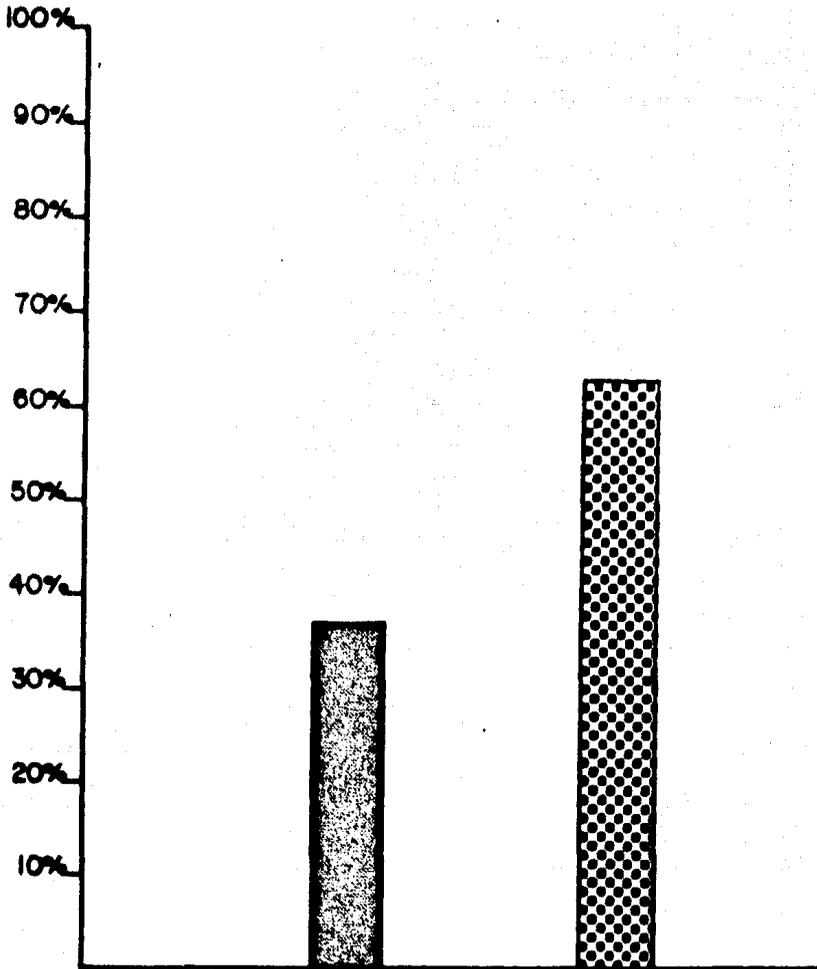
Resultados obtenidos por ambos métodos en 110 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico expresados en porcentaje (ver las gráficas números 4 y 5):

resultados	inmunofluorescencia indirecta	ELISA
negativos	38.18 %	37.28 %
positivos	61.82 %	62.72 %

Porcentaje de los patrones de tinción inmunofluorescente en los resultados obtenidos por el método de inmunofluorescencia indirecta en los 110 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, utilizando como sustrato hígado de ratón (ver gráfica número 5):

METODO DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	
Patrón	porcentaje
homogéneo	39.01 %
periférico	3.62 %
moteado	19.09 %
nucleolar	0 %

Gráfica No. 4



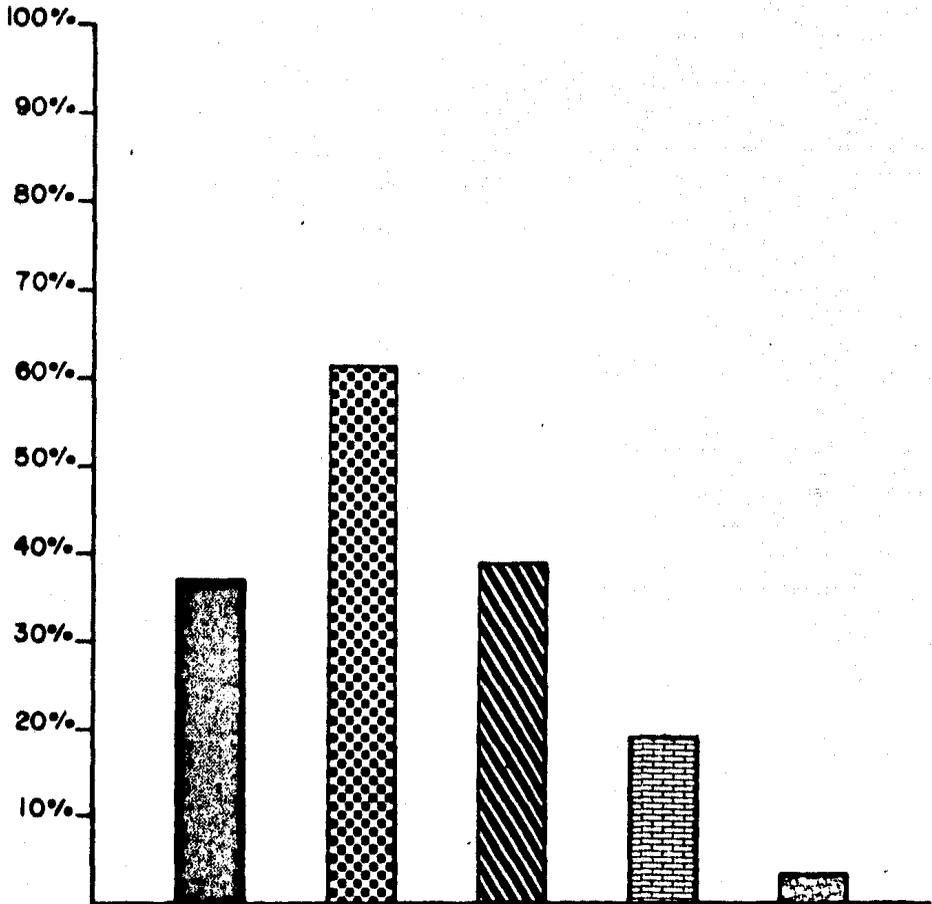
NEGATIVOS



POSITIVOS

GRAFICA DEL PORCENTAJE DE RESULTADOS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES OBTENIDOS POR EL METODO ELISA EN 110 PACIENTES CON DIAGNOSTICO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.

Gráfico No. 5



NEGATIVOS



POSITIVOS



PATRÓN HOMOGÉNEO



PATRÓN MOTEADO



PATRÓN PERIFÉRICO

GRÁFICA DEL PORCENTAJE DE RESULTADOS DE ANTI-CUERPOS ANTINUCLEARES OBTENIDOS POR EL MÉTODO DE INMUNOFLORENCIA INDIRECTA EN 110 PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.

R E S U M E N

Se presenta el estudio de 110 personas con diagnóstico de -- lupus eritematoso sistémico y que son pacientes del Servi-- cio de Reumatología del Hospital de Especialidades del Cen-- tro Médico la Raza.

En él se evaluaron anticuerpos antinucleares por dos méto-- dos: Inmunofluorescencia indirecta (utilizando como sustra-- to cortes de hígado de ratón) y ELISA. Y se realizó un aná-- lisis comparativo de los resultados de ambos métodos.

También se hizo el estudio en un grupo de 30 personas aparen-- temente sanas, con el objeto de evaluar los valores de refe-- rencia para cada método. Y así poder compararlos con el gru-- po de estudio con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico.

Se realizó el análisis estadístico para ver si existía corre-- lación entre los dos métodos empleados. Obteniéndose una - correlación global de $r=0.31$, con $n=110$ y una $p < 0.01$.

Debido a que la determinación de anticuerpos antinucleares - por el método de inmunofluorescencia indirecta presenta cua-- tro patrones de tinción inmunofluorescente (homogéneo, perif-- érico, moteado y nucleolar) se realizó una comparación de -

los datos de la prueba ELISA con cada patrón de tinción -
inmunofluorescente, calculando el factor de correlación -
por regresión de mínimos cuadrados.

En los resultados obtenidos se observó diferente correla-
ción entre cada patrón inmunofluorescente del método de -
inmunofluorescencia indirecta y la prueba ELISA. Para el
patrón homogéneo se obtuvo una $r=0.51$, con $n=85$ y $p<0.01$,
para el periférico se obtuvo una $r=0.91$, con $n=46$ y $p<0.01$,
y para el moteado se obtuvo una $r=0.17$, con $n=63$ y $p>0.05$.

C O N C L U S I O N E S

En este estudio se realizó una comparación de los métodos de inmunofluorescencia indirecta y ELISA en la determinación de anticuerpos antinucleares.

La determinación de anticuerpos antinucleares se utiliza en forma rutinaria por su utilidad en el diagnóstico y seguimiento de las enfermedades reumáticas (6). Este trabajo se realizó con el fin de evaluar la metodología utilizada en forma rutinaria. Ya que se ha utilizado en el laboratorio el método de inmunofluorescencia indirecta, pero debido al aumento gradual de exámenes se trató de adaptar un método más accesible en este caso ELISA. Se realizó un análisis estadístico en los resultados obtenidos por ambos métodos en el suero de 110 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico.

En el método de IFI se eligió como sustrato el hígado de ratón debido a que su manejo y obtención es más fácil que otros órganos o sustratos, además los cortes de este órgano presentan muy poca fluorescencia inespecífica, asimismo la literatura señala que es uno de los sustratos más utilizados en la determinación de los anticuerpos antinucleares (13). En la prueba de ELISA sólo se utiliza como sustrato desoxirribonucleoproteína de timo de ternera.

De los métodos utilizados en este trabajo para la determinación de anticuerpos antinucleares, ELISA e IFI, la sensibilidad resultó ligeramente mayor en el método ELISA, ya que el porcentaje de resultados positivos fué de 62.72%, mientras que en el método de IFI fué de 61.82%.

El porcentaje de los patrones de tinción inmunofluorescente obtenidos en los 110 pacientes con diagnóstico de lupus eritematoso sistémico, fué el siguiente: 39.01% para el patrón homogéneo, 3.62% para el periférico, 19.09% para el moteado y 0% para el nucleolar. Esta relación está sujeta a estudios posteriores ya que no se tomó en cuenta el tratamiento, ni la etapa del padecimiento de los pacientes.

En el análisis estadístico global de los resultados de ambos métodos se observó una correlación significativa, ya que se obtuvo una $r=0.37$ y $n=110$, con una $p < 0.01$. Pero debido a que el método de inmunofluorescencia indirecta presenta cuatro patrones de tinción inmunofluorescente, se realizó el análisis estadístico entre los resultados obtenidos por ELISA y cada uno de los patrones, obteniéndose diferencias significativas.

La buena o mala correlación entre cada patrón de tinción inmunofluorescente del método de inmunofluorescencia indirecta y ELISA, se debe a que mientras la prueba de inmunofluorescencia indirecta (utilizando cortes de hígado de ratón) detecta anticuerpos dirigidos a una variedad de antígenos nucleares, ELISA sólo determina anticuerpos dirigidos a desoxirribonucleoproteínas.

Cada patrón de tinción inmunofluorescente se encuentra asociado a ciertos antígenos nucleares, y así tenemos -- que el patrón homogéneo se encuentra asociado a desoxirribonucleoproteínas, complejos de DNA-histonas e histonas. Por lo que existe una buena correlación entre este patrón de tinción y el método ELISA, $r=0.51$, $n=85$ y $p < 0.01$.

El patrón periférico se encuentra asociado a DNA de doble cadena, desoxirribonucleoproteínas y complejos de DNA-histonas. Por lo que existe muy buena correlación entre este patrón de tinción y el método ELISA, $r=0.91$, $n=4$ y $p < 0.01$.

El patrón moteado se encuentra asociado a antígenos ENA - (antígenos extraíbles del núcleo por solución salina isotónica) que no contiene el método ELISA en la fase sólida.

Por lo que no existe correlación significativa entre este patrón y el método ELISA, $r=0.17$, $n=63$ y $p>0.05$.

En el patrón nucleolar no fué posible realizar esta comparación debido a que generalmente se encuentra asociado con otros patrones. Además que los sustratos ideales para este patrón son las células de cultivos celulares por tener nucleolos grandes y numerosos (6).

De este trabajo se puede concluir que aunque generalmente el método ELISA resulta más sensible, cuantitativo -- y específico, en el caso de la determinación de anticuerpos antinucleares, los métodos de ELISA e IFI podrían -- ser complementarios, debido a que en las enfermedades -- reumáticas existe una variedad de autoanticuerpos con diferente especificidad, y el método ELISA sólo detecta -- anticuerpos para desoxirribonucleoproteínas, mientras -- que el método de IFI determina anticuerpos para una variedad de antígenos que están relacionados con patrones de tinción inmunofluorescente.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- ALARDEN, L.A.
Immunology of DNA III. A simple substrate for the detection of anti-DNA with the immunofluorescence technique.
Ann. Ny. Acad. Sci. Vol. 254. 505-510. (1975)
- 2.- BARNETT, E.V.
Immunofluorescence test in immune technics and applications.
Am. J. Clin. Pathol. Vol. 68 (5 Suppl.) 662-663 (1977).
- 3.- BLOCH, K.J.
Use and interpretation of diagnostic immunologic laboratory test.
JAMA. Vol. 248, No. 20 2734-2751. (1982)
- 4.- COHEN, A.S.
Preliminary criteria for the diagnosis of systemic lupus erythematosus.
Bull. Rheum. Vol. 21. 643-647. (1971)
- 5.- COHEN, A.S.
Diagnóstico de laboratorio en las enfermedades reumáticas.
Salvat editores. Barcelona, España. 155-194. (1982)
- 6.- DAVIS, J.S.
Antinuclear antibodies.
Textbook of Rheumatology edited by WN Kelly, ED. Harris, S. Ruddy, CB Sledge. Philadelphia WB Saunders. 691-706 (1980).
- 7.- FRIOU, G.J.
Clinical application of lupus serum-nucleoprotein reaction using florescent antibody technique.
J. Clin Invest. Vol. 36. 890. (1957)

- 8.- FUDENBERG, H.H.
Inmunología clínica.
Ed. El Manual Moderno, S.A., México, D.F. 452-481. (1982)
- 9.- HARGRAVES, M.M.
Presentation of two bone marrow elements: The "tart" --
cell and "L.E." cell.
Proc. Staff. Meet. Mayo clin. Vol. 23. 25-28 (1948)
- 10.- HASERICK, J.R.
The bone marrow as a diagnostic aid in acute dissemina
ted lupus erythematosus.
J. Invest. Dermatol. Vol. 11. 209-214 (1948)
- 11.- HOLBOROW, E.J.
A serum factor in lupus erythematosus with affinity --
for tissue nuclei.
Br. Med. J. Vol. 2. 732-739. (1957)
- 12.- LORINCZ, L.L.
Antinuclear antibodies.
International Journal of Dermatology. Vol. 20. 401-410.
(1981)
- 13.- NAKAMURA, R.M.
Immunossay in the clinical laboratory.
New York, Alan R. Liss Inc. 247-284. (1979)
- 14.- NOTMAN, D.D.
Profiles of antinuclear antibodies in systemic rheumatic
disease.
Ann. Intern. Med. Vol. 83. 464-469. (1975)
- 15.- REES, A.J.
Autoimmunity and autoimmune disease.
Br. J. Anaesth. Vol. 51. 13-20. (1979)

16.- REICHLIN, M.

Current perspectives on serological reactions in SLE patients.

Clin. Exp. Immunol. Vol. 44. 1-10 (1981)

17.- R.N. MALINE

Inmunología de las enfermedades reumáticas

Ed. El Manual Moderno, S.A., México, D.F. (1978)

18.- TAN, E.M.

The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus.

Arthritis and Rheumatism. Vol. 25, No. 11. 1271-1277.
(1982)

19.- TAN, E.M.

The biological and diagnostic significance of antinuclear antibodies.

Aust. NZ. J. Med. Vol. 11. 193-196 (1981)

20.- WIIK, A.

Antinuclear factors in sera from healthy blood donors.

Acta Pathol. Microbiol. Scand. Vol. 84. 215-219 (1971)

ABREVIATURAS

AR artritis reumatoide
DNA ácido desoxirribonucleico
DNA-DC ácido desoxirribonucleico de doble cadena o nativo
DNA-UC ácido desoxirribonucleico de una sola cadena
EMTC enfermedad mixta del tejido conectivo
ENA antígenos extraíbles del núcleo celular en una so-
 lución salina isotónica.
ESP esclerosis sistémica progresiva
HCA hepatitis crónica activa
IF inmunofluorescencia
IFI inmunofluorescencia indirecta
LES lupus eritematoso sistémico
NP desoxirribonucleoproteína de timo de ternera
RNAsa ribonucleasa
RNP ribonucleoproteína
SAF solución amortiguadora de fosfatos
TRIS tris-hidroximetil amino-metano