



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Hospital Ángeles Lomas
Departamento de Medicina Interna

***“Sensibilidad de los anticuerpos antinucleares para la
detección de anticuerpos anti-SSA”***

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALISTA
EN MEDICINA INTERNA

Presenta:

Dr. Iván Eduardo Alcántara Arreola

TUTOR PRINCIPAL: Dr. Alejandro Díaz Borjón.
Servicio de Reumatología Hospital Ángeles Lomas.

México D.F., Noviembre de 2015



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.

GENERALIDADES

Las enfermedades sistémicas autoinmunes comúnmente se caracterizan por la presencia de autoanticuerpos contra antígenos propios. De hecho, el diagnóstico, clasificación y pronóstico de las enfermedades autoinmunes se basa, en manifestaciones clínicas y evaluación de laboratorio, particularmente en la presencia de ciertos títulos de auto-anticuerpos específicos.(1, 2)

Descritos en 1957(4, 5), los anticuerpos antinucleares (AAN) dirigidos contra una variedad de antígenos nucleares, han sido detectados en el suero de pacientes con enfermedades reumáticas y no reumáticas, así como en pacientes con síndromes clínicos no identificables, e incluso pueden estar presentes en individuos sanos.(2, 6, 7) El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune prototipo, donde los autoanticuerpos están dirigidos contra antígenos intracelulares del núcleo (ADN de cadena única y doble, ssADN y dsADN, respectivamente), histonas, y antígenos nucleares extraíbles (ENAs por sus siglas en inglés). Muchos de estos autoanticuerpos no son específicos para LES y pueden ser producidos como resultado de la activación policlonal de células B(8). Los autoanticuerpos son policlonales de forma frecuente - de isotipo, afinidad y avidez mixta- y están dirigidos contra múltiples blancos. Diferentes ensayos detectan propiedades particulares de los anticuerpos, cuya importancia clínica para la patogénesis o diagnóstico no ha sido bien entendida hasta ahora. La inmunodifusión (ID) detecta anticuerpos de alta afinidad, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) anticuerpos de moderada y alta afinidad, y el ensayo de inmunoabsorción asociado a enzimas (ELISA) anticuerpos de baja y alta afinidad.(6, 8).

Pruebas para Detección de Anticuerpos Antinucleares

Las distintas pruebas contienen antígenos recombinantes que pueden tener ciertos epítopes, tener glicosilación alterada o estructura terciaria, o tener contaminantes de antígenos bacterianos. Cualquier anticuerpo contra componentes nucleares es un AAN.

Una prueba ideal debería ser específica (detecta sólo aquellos sanos cuando es negativa), sensible (detecta todos aquellos enfermos cuando la prueba es positiva), tener un alto valor predictivo positivo (VPP) –donde la mayoría de los positivos tengan la enfermedad, y alto valor predictivo negativo (VPN) –donde la mayoría de los negativos no tengan la enfermedad.

Una prueba positiva para AAN (por cualquier método) es uno de los criterios para la clasificación de LES, enfermedad mixta del tejido conectivo (EMTC) y síndrome de Sjögren, además funciona como criterio diagnóstico en la práctica diaria.(9, 10) Muchos pacientes con AAN no tienen LES, pero la gran mayoría de pacientes con LES tienen AAN. El método de escrutinio de elección para AAN es por IFI en hígado de roedor o tejido epitelial humano (HEp-2) (11, 12). La primera es una línea celular establecida en 1952 por Alice E Moore *et al.* y que está comprendida por miles de autoantígenos potenciales(13) (existen múltiples preparaciones disponibles en el mercado)(3, 8, 14); se realiza en riñón de roedor o en hígado humano. La segunda (HEp-2), mejora la sensibilidad para la detección de AAN y hace más fácil la identificación de los diferentes patrones(4). Los cultivos de células epiteliales HEp-2 (carcinoma laríngeo humano, American Type Culture Collection CCL-23) son los más usados ya que el núcleo y nucleolo en estas células son grandes y contienen mayor cantidad de antígeno SS-A, reduciendo el número de pacientes con LES AAN-negativo.(3, 6, 9, 14) Estas células crecen en una placa de vidrio y se permeabilizan para permitir la entrada de anticuerpos a la célula. Ambas estructuras, nucleares y citoplasmáticas, son fácilmente reconocibles en cultivo de células fijadas. Además, forman una población homogénea sin mucha matriz extracelular. En un cultivo no sincronizado, los antígenos que se expresan durante ciertas etapas del ciclo celular también han sido descritos. Esto permite la detección de anticuerpos dirigidos hacia antígenos relacionados al ciclo celular que raramente se expresan en secciones tisulares.(3) Los AAN en HEp-2 sirve como prueba de escrutinio de primera línea para excluir la presencia de una enfermedad sistémica autoinmune con aparente gran exactitud.(15, 16)

Interpretación de Anticuerpos Antinucleares

Aunque los AAN son muy sensibles para LES, tener AAN positivo es común, especialmente en personas ancianas. Por lo tanto, los AAN tienen poco VPP para LES en poblaciones no seleccionadas (pero alto para las enfermedades del tejido conectivo(12)) o cuando está presente en títulos bajos y no son diagnósticos.(8) Los AAN realizados en células Hep-2 son anormales de forma más frecuente en pacientes con cualquier enfermedad asociada a ellos (i.e., sensibilidad aumentada), pero más pacientes sin enfermedades asociadas a AAN tendrán resultados anormales (i.e., menor especificidad).(5, 6) Una en tres personas sanas tendrán AAN por Hep-2 en diluciones de escrutinio de 1:40 y una en veinte serán positivas a 1:160. Las células HEp-2 producen más AAN positivos que el tejido de rata, y algunos AAN (por ejemplo, anticuerpos anticentrómero) pueden ser detectados de forma confiable en sustrato HEp-2. La variabilidad de los resultados de las pruebas de AAN puede deberse a cualquiera de los siguientes: potencia de las anti-gamaglobulinas marcadas con fluoresceína; la especificidad de la anti-gamaglobulina (e.g., anti-IgG, IgA, IgM); y potencia del foco UV en el microscopio de fluorescencia.(6) Diferentes procedimientos de fijación pueden producir diferentes patrones de AAN; la fijación con acetona principalmente estabiliza el antígeno SSA/Ro en células Hep-2, pero el etanol o metanol puros fueron menos eficaces. Algunas preparaciones comerciales de células HEp-2 no son adecuadas para la detección de anti-SSA. Esto es un obstáculo, especialmente para caracterizar suero AAN-negativo y anti-SSA positivo. Recientemente, para solucionar este problema, se encuentra disponible un kit comercial con sustrato HEp-2 con adición de cDNA que codifica para 60kDa SSA/Ro.(3)

Lupus Seronegativo

El concepto de lupus AAN-negativo fue acuñado por primera vez por Koller et al. en 1976 con la descripción de 5 pacientes con AAN-negativo persistente a pesar de tener características clínicas consistentes con LES.(16, 18) En 1981, fue publicado un artículo describiendo 66 pacientes con hallazgos clínicos de LES leve pero muestras persistentemente negativas para AAN en sustrato de hígado de ratón. Estos pacientes fueron designados como LES AAN-negativo y fueron caracterizados serológicamente como LES ya que 62% tuvieron anticuerpos precipitantes a la partícula SSA/Ro, 31% tuvieron anticuerpos precipitantes a SSB/La (también tuvieron SSA/Ro), y 27% tuvieron anticuerpos solamente contra ssDNA(10, 19, 20); estos pacientes tuvieron seguimiento cercano por un dermatólogo debido a dermatitis fotosensible extensa. Muchos de estos pacientes demostraron características sistémicas como artralgias y leucopenia pero, debido a la ausencia de AAN, fueron ignorados por internistas y reumatólogos.(21) Aunque el "LES AAN-negativo" está reportado, no queda claro si es el resultado de un artefacto técnico o, bien, si es un subgrupo de pacientes con LES(8); Faria et al., analizaron la fluctuación longitudinal de anti-dsDNA, anti-U1-RNP, anti-Sm, anti-SSA/Ro, y anti-SSB/La en pacientes con lupus. De forma interesante, sus resultados encontraron que tanto anti-SSA/Ro como anti-RNP mostraron un patrón relativamente estable, pero anti-Sm mostró fluctuación.(22) El cambio de tejido de rata al uso de células HEp-2 pudo haber disminuido la proporción de casos de LES AAN-negativo, pero de ninguna forma excluye la posibilidad de que el suero de pacientes AAN-negativo contengan anticuerpos contra SSA/Ro.(23)

Grandes series han reportado 5% de pacientes con LES con negatividad para AAN.(19, 24) En todos los pacientes y para todas las detecciones por IFI, hubo amplias variaciones en el grado de positividad de la medición de AAN, reflejado por el amplio intervalo de títulos de AAN. Esta falta de concordancia entre laboratorios ha sido demostrada y no es del todo sorprendente debido a la interpretación subjetiva de los resultados que depende de la experiencia y conocimiento del operador y las variaciones en las técnicas de IFI, incluyendo variaciones en fijación y sustrato, diferencias en conjugados y en ópticas microscópicas. Después de haber estandarizado para patrón homogéneo de AAN 66/233 (una reserva congelada de suero de 6 pacientes con diagnóstico de LES) con la Organización Mundial de la Salud, se observó una mejor concordancia interlaboratorios con menor dispersión de los resultados.(25) Una gran cantidad de pacientes, por quienes se acuñó el término LES AAN-negativo", tienen reactividad predominantemente a SSA/Ro; si bien mostraron negatividad a AAN en sustrato de tejido de

roedor, casi siempre son positivos cuando se utiliza sustrato HEp-2.(5) La literatura reporta que usar células HEp-2 como sustrato elimina virtualmente los resultados falsos-negativos de AAN.(5) Aunque raro, es posible encontrar pacientes AAN-negativos con enfermedad activa; estos pacientes corren el riesgo de ser subdiagnosticados.(19) Los mecanismos posibles involucrados en esta asociación frecuente incluye un exceso de antígenos circulantes o niveles bajos de inmunoglobulinas séricas asociadas con proteinuria masiva.(26) Los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR por sus siglas en inglés) se refieren a títulos “anormales” de autoanticuerpos, pero no hay valor de corte que distinga de forma absoluta lo normal de la enfermedad autoinmune. En general, entre más alto sea el título tiene mayor significado, particularmente en pacientes jóvenes. La medición de AAN es a lo mucho semi-cuantitativa, y es pobremente estandarizada entre laboratorios debido a la falta de preparaciones de referencia. La precisión y exactitud de las técnicas depende de la configuración del ensayo, el control de calidad de los procedimientos, y la experiencia del lector. Los patrones pueden sugerir especificidades de anticuerpos pero no son diagnósticos.(8) Otra variable que afecta la confiabilidad de los AAN es la introducción reciente de la tecnología ELISA.(6) La tecnología ELISA domina la práctica de laboratorio de rutina, pero tiende a producir más resultados falsos positivos y débiles verdaderos positivos, lo cual reduce el VPP de la prueba. Esto puede reducirse al usar conjugados específicos a IgG y validación cuidadosa del ensayo. El VPN para LES es alto para la mayoría de ensayos pero el VPP varía.(8) Existen pacientes con LES definitivo que son AAN-negativo, pero si constituyen más de 5% se recomienda que el método se estudie una vez más aunque, estadísticamente 5% es aceptable.(27)

Un comité designado por el ACR concluyó que la IFI debe considerarse como el método de elección para la detección de AAN en pacientes con sospecha de enfermedad autoinmune asociada a los mismos.(11) La determinación de autoanticuerpos hacia antígenos nucleares extraíbles (anti-ENA) y anti-ADN de doble cadena (anti-dsDNA por sus siglas en inglés) está indicado sólo para los pacientes con AAN positivo.(11) Se ha tomado la práctica de evaluar de forma subsecuente para otros anticuerpos a los pacientes con AAN positivo. Esta evaluación en cascada aumenta la velocidad y mejora la exactitud del diagnóstico.(6) A excepción de casos raros, la evaluación subsiguiente de anticuerpos, si el paciente es AAN negativo, no está indicada (los autoanticuerpos específicos son casi siempre negativos en pacientes sin positividad para AAN).(5, 16) Pocos estudios han demostrado la utilidad de tal práctica; aún queda por comprobarse que la evaluación en cascada ofrezca ventajas sobre la evaluación enfocada de autoanticuerpos específicos basado en sospecha clínica. Por lo tanto, hasta que ésta práctica se compruebe en estudios rigurosos, no puede ser recomendada universalmente.(6) Cuando se realizan determinaciones de AAN de rutina, es importante recordar que la prueba es primeramente de escrutinio antes de realizar pruebas serológicas más definidas.(27) Basado en una observación hecha por Solomon et al., el resultado negativo de AAN ayuda a descartar LES ya que es una prueba muy sensible. En la mayoría de pacientes en los que se sospecha LES, los AAN son la mejor prueba de inicio.(6) La mayoría de los kits están diseñados para que el 95% de los sueros de controles sanos no muestren marcado, mientras que el suero con autoanticuerpos con relevancia diagnóstica se detecten. En el caso de un resultado positivo, la prueba se repite usando series geométricas de diluciones de acuerdo a la fortaleza de la fluorescencia primaria (1:160 a 1:5120). Los títulos de al menos 1:160 se interpretan con relevancia diagnóstica.(11, 14)

Al usar un corte de 1:160 por IFI, se puede disminuir el número de falsos positivos, lo cual es especialmente importante para poblaciones con alta prevalencia de AAN. Los títulos bajos de AAN están raramente presentes en pacientes con enfermedades autoinmunes, pero se observan alrededor de 30%-40% de los individuos sanos. Estos resultados reflejan principalmente autoanticuerpos naturales con baja avidéz. Se sabe que la prevalencia de AAN varía de forma amplia entre poblaciones de países diferentes, y se reportó en 24% en los EUA y 54% en México, en la población general.(11)

COMPARACIÓN DE TÉCNICAS

La inmunofluorescencia es una técnica laboriosa que requiere personal altamente calificado para su correcta interpretación. La dificultad para diagnosticar enfermedad autoinmune incrementa el número de pruebas que se solicitan a laboratorios centrales alcanzando algunos de estos más de 160, 000 muestras procesadas anualmente. El esfuerzo por desarrollar métodos más simples ha sido considerable e incluye el desarrollo de técnicas por ELISA y la “inmunofluorescencia por microesferas múltiples” que detectan tanto AANs como ENAs(33). Los datos que están disponibles comparando nuevos ensayos con métodos tradicionales permiten observar que los métodos multiplex tienen menores tasas positivas, sin embargo tienen un mayor riesgo de falsos positivos que con la técnica de inmunofluorescencia; lo mismo aplica para métodos de ELISA(53). Estos nuevos métodos no concuerdan al 100% con la inmunofluorescencia indirecta y la falta de estandarización e inconsistencias interensayo se ha convertido en un creciente problema(33). El riesgo clínico de un falso negativo es predecible, manejable porque tanto el LES como el SS son síndromes definidos clínicamente.(29) El antígeno SSA/Ro se presenta usualmente en baja proporción en células intactas, en contraste con otros antígenos nucleares como SSB, ribonucleoproteína (RNP), Smith (Sm) y dsADN, que se presentan en abundancia. Esto, y el hecho de que el antígeno SSA/Ro puede desaparecer del núcleo durante la fijación, produce de manera común resultados negativos en la técnica IFI.(31) Estudios comparativos entre ELISA e inmunofluorescencia evaluando distintos sustratos han demostrado un mayor coeficiente de variabilidad inter e intraensayo con kits que utilizan tejido o células como sustrato antigénico.(29) El IFI es un método manual y tiene algunas limitantes: poca reproductibilidad intra e inter laboratorio, falta de estandarización debido a diferencias en el montaje de tejidos o células, el tiempo de incubación, la elección del campo en el microscopio y de la experiencia del microscopista.(30) Maguire et al. mostraron que en el seguimiento a 1 año de AAN, los pacientes que son AAN-negativos por ELISA y AAN-positivos por IFI son indistinguibles en síntomas relacionados a LES de aquellos pacientes que son negativos para ELISA e IFI.(32) Bernardini *et al.* compararon las tres fuentes de antígenos de (ELISA) contra IFI para determinar la mejor prueba de escrutinio. . La sensibilidad clínica del IFI (utilizando un corte de 1:80) fue de 77% en el diagnóstico de enfermedades de tejido conectivo (LES, síndrome de Sjögren y esclerosis sistémica) y 91% en el diagnóstico sólo de LES. La especificidad clínica del IFI fue de 86%. La sensibilidad más alta de los métodos investigados limitado al diagnóstico de LES fue similar a lo reportado en la literatura, el escrutinio de AAN tuvo menor valor diagnóstico en Sjögren y esclerosis sistémica que en LES. El método IFI para la detección de AAN parece ser la primer elección en un laboratorio bien estandarizado con un microscopista experimentado, mientras que el ELISA puede ser una buena herramienta diagnóstica especialmente para detección de AAN a gran escala considerando la posibilidad de usar instrumentos automatizados y de obtener datos objetivos y cuantitativos.(30) La prueba para la detección de AAN recomendada es la microscopía por inmunofluorescencia, particularmente la IFI basada en sustrato HEp-2. La detección de AAN por ELISA generalmente arroja resultados tan buenos como el tradicional IFI en cuanto a sensibilidad. Sin embargo, hay espacio para mejoría de la detección por ELISA, que puede incluir la adición de antígenos purificados nuevos o recombinantes en el ensayo.(34) Como consecuencia, los patrones de fluorescencia usualmente son descritos claramente. (33)

La alta sensibilidad del ELISA le permite ser usado como escrutinio para AAN para que los sueros negativos puedan ser reportados de forma directa, mientras que los positivos por ELISA puedan ser comprobados por inmunofluorescencia. Debido a la baja especificidad del ELISA (36% a 94%), todas las pruebas positivas deben ser corroboradas por inmunofluorescencia para confirmar la presencia de AAN y en qué título y patrón. Utilizando un ELISA con 95% o mayor sensibilidad permitiría al laboratorio reportar la mayoría de las muestras, que son negativas, a menor costo y con menor tiempo de respuesta.(29)

En un estudio realizado por Ulvestad *et al.*(29), 43 de las 680 muestras evaluados demostró positividad exclusivamente para SSA/SSB. La mayoría de los laboratorios hoy en día usan las células HEp-2 como fuente de antígenos nucleares(37, 38) y en 2009 ratificando esto nuevamente el ACR declaró la inmunofluorescencia indirecta utilizando células HEp-2 como

estrato como método ideal de escrutinio. Estudios comparativos entre diferentes kits para detección de anticuerpos que utilizan HEp-2 como sustrato antigénico muestran que la variabilidad interensayo es frecuente aunque existe muy buena concordancia entre diferentes operadores al momento de evaluar la misma muestra, reportado en 72% específicamente para LES. Hay muchos factores que pueden contribuir a esto, la proporción de fluorescencia/proteína o el fijador. Este último se prefiere de acetona pura que alcanza sensibilidad de 97.5% vs 81.3% en combinación con alcohol para la detección de SSA/Ro. Otro problema es el tipo de conjugado, que se prefiere sea específico Fc IgG para mejorar el valor predictivo positivo del ensayo(33). La presencia de LES AAN negativo puede en ocasiones ser una mala identificación de especificidades por el sustrato, como es el caso de células HEp-2 para identificar SSA/Ro. Es conveniente la adición de antígenos específicos que usualmente las células HEp-2 no identifican como lo es SSA/Ro en conjunto con los demás ENA(37). Algunos de los kits comerciales (LIASON) alcanzan sensibilidad de 94% y una especificidad mayor a 99%(55). Sin embargo, estudios multicéntricos comparando hasta 8 kits comerciales por ELISA contra IFI con cortes de 1:160 han reportado sensibilidad desde 69.5% al 97.7% y especificidad que va desde 66.9% 97.7%.(29) Olaussen *et al.* observaron un grado de discrepancia modesto pero similar entre dos pruebas clásicas de inmunofluorescencia para la detección de AAN, entre HEp-2 y ELISA I, y entre ELISA I y ELISA II. El repertorio de antígenos usados en los sistemas ELISA permite la detección de una población dominante y clínicamente central de especificidades de AAN.(41) Aunque la inmunofluorescencia ofrece el escrutinio de anticuerpos hacia numerosos antígenos nucleares, pueden perderse especificidades importantes, e.g. SSA/Ro y Jo-1.(37) Las discrepancias pueden ser explicadas por la calidad de antígenos puros o recombinantes, alteraciones estructurales y cuantitativas, la alteración potencial de la estructura de epitopes en la capa de la microplaca, la cantidad de cada antígeno en la mezcla y su acceso para asegurar la sensibilidad y especificidad comparables, la presencia de extractos de HEp-2 y el nivel de corte para mantener valor clínico(55). La metodología por inmunofluorescencia dista mucho de ser perfecta por todo lo anteriormente mencionado; requiere mejoras importantes en cuanto a falta de recursos tanto materiales como humanos, el bajo nivel de estandarización, la variabilidad interobservador y el efecto de “blanqueamiento por luz”(53). Ulvestad encontró en un estudio que 31 sueros para inmunoensayo en línea (LIA) eran negativos para IFI; 26 de estos sueros mostraron positividad para SSA/Ro-52 mientras que 5 mostraron positividad para Scl-70. Vos *et al.* y Hoffman *et al.* tuvieron observaciones similares. Esto se explica por el hecho de que el LIA es más sensible para la detección de SSA/Ro-52 que IFI incluso cuando se utilizan células HEp-2(56). 95%-98% de la gente con LES tiene AAN positivo, pero menos del 5% puede tener AAN negativo y aún así tener LES. Estas personas usualmente tienen una prueba positiva para anti-Ro (SSA) o anti-La (SSB).(29) Dahle *et al.* analizaron 3079 muestras consecutivas de diferentes pacientes en el laboratorio para inmunología clínica para análisis de rutina de AAN durante 12 meses. 375 sueros (12%) fueron ANA positivos ya fuera por IFI y/o por identificación de precipitinas en la prueba cDRID (medición cuantitativa de antígeno en gel de agar en el que, al llegar a una relación adecuada entre antígeno y anticuerpo, se observan anillos de precipitación). En total, los AAN (1:100) fueron detectados por microscopía de IFI en 340 sueros (11%). 230 de estos (68%) resultaron negativos tanto en EIA como en ihDRID; 206 sueros (7%) fueron positivos en al menos una de las pruebas de escrutinio, pero negativos en las células HEp-2. La especificidad del antígeno fue identificada por el cDRID en 35 de esos casos (17%). Treinta y dos fueron anti-SSA positivos (91%), dos de los cuales tenían anti-SSB (6%). Los anticuerpos anti-Scl-70 se confirmaron por cDRID en un suero, los anti-snRNP en otro, los anti-Jo-1 en una tercera muestra. La microscopía por IFI en células HEp-2 se realizó en 136 sueros positivos para anti-SSA por cualquiera de los métodos. De estos, el patrón típico de anti-SSA fue visto en células HEp-2 en 55 casos (40%). Setenta y seis de los 136 sueros tenían anticuerpos anti-SSA precipitantes por cDRID, y de estos 46 (61%) fueron capturados por HEp-2000; estos resultados confirman que la microscopía por IFI no es suficiente como única prueba para escrutinio de AAN; la IFI en células HEp-2 suplementada con pruebas adicionales específicas contra antígenos (el más importante SSA/Ro) es óptimo.(37) Aún así, además de la microscopía por IFI usando células HEp-2 o HEp-2000 como sustratos de antígenos nucleares, se recomienda el uso de ensayos suplementarios (e.g. ELISA) para no perder pacientes positivos

a SSA/Ro60(57). De hecho, la detección de reactivos nucleares específicos como SSA y RNP ha sido reportado en pacientes con IFI negativo debido a baja expresión de estos antígenos y/o pobre fijación de células(33).

La interpretación para el clínico depende en mucho de todos estos factores que no son reportados habitualmente junto con los resultados, el conocimiento profundo del laboratorio con que el profesional de salud trabaje es indispensable.(29)

ANTICUERPOS SSA/Ro

El antígeno SSA/Ro fue descrito por primera vez en 1962 por Anderson *et al.*(1) En 1969, Clark *et al.* detectaron un nuevo antígeno citoplasmático designado Ro, que reaccionó con el suero de pacientes con LES. La caracterización bioquímica reveló que el antígeno Ro era un componente citoplasmático soluble con la movilidad electroforética de una α -globulina, resistente a enzimas proteolíticas como la tripsina. En 1975 Alspaugh y Tan describieron 3 tipos de anticuerpos precipitantes en el suero de pacientes con síndrome de Sjögren. Una de estas precipitinas, designada SSA (antígeno a del síndrome Sjögren, por sus siglas en inglés), contenía un componente nuclear de una línea celular linfocítica humana. Estos investigadores reportaron que la reactividad del antígeno SSA se destruía con el tratamiento con tripsina pero permanecía a pesar del uso de RNasa y DNasa. Después Alspaugh y Maddison, en una colaboración interlaboratorios, utilizando inmunodifusión doble en agar, demostraron la identidad inmunológica entre los anticuerpos anti-Ro y anti-SSA sugiriendo que los antígenos Ro y SSA eran proteínas idénticas.(1, 42, 43) En 1981, Lerner *et al.* demostraron que el antígeno Ro estaba asociado con muchos RNAs citoplasmáticos pequeños designados hY1-hY5(42, 44) en células humanas. Sus tamaños iban de 83 a 112 nucleótidos. Así fue como se definió al antígeno Ro, por primera vez, como una proteína de unión a ácido ribonucleico (RNP, por sus siglas en inglés).(42) Los anticuerpos Anti-Ro y anti-La se encuentran en aproximadamente 60%-90% y 30%-60% de los pacientes con síndrome de Sjögren primario, así como en 30%-40% y 10%-15% de los pacientes con LES, respectivamente.(2) El antígeno SSA/Ro consiste de dos componente polipéptidos de 52 y 60 kDa. En humanos, la proteína Ro de 60-kDa tiene un dominio de unión a RNA, mientras que la proteína de 52-kDa (Ro52) tiene un dedo de zinc y cremallera de leucina pero no se une directamente a RNA. Las interacciones moleculares entre la cremallera de leucina o Ro52 y tres péptidos del Ro 60-kDa muestran que el Ro52 une el complejo Ro-RNP como resultado de una interacción de aminoácidos. A diferencia de las proteínas Ro 60-kDa y SSB, la molécula Ro52 es específica a humanos y monos y, partículas citoplasmáticas de ribonucleoproteínas (hYRNPs), pueden ser halladas en la membrana citoplasmática o en pequeñas inclusiones durante la apoptosis como reacción contra un estímulo tal como la luz ultravioleta B (UVB), 17- β -estradiol, infección viral, factor de necrosis tumoral- α (TNF α) y otras moléculas inductoras de la apoptosis celular.(1, 45, 46, 47) De entre una gran variedad de autoanticuerpos, el sistema de autoanticuerpos SSA/Ro (Ro60 y Ro52) es el ENA con mayor especificidad y mayor prevalencia identificado en los laboratorios. Los anticuerpos anti-Ro52 y anti-Ro60 tienen asociaciones clínicas diferentes.(1) Itoh *et al.* han mostrado que el suero con precipitinas anti-SSA/Ro tienen anticuerpos que reconocen de forma amplia la forma nativa del antígeno 60-kDa. El suero con anticuerpos anti-SSA/Ro y anti-SSB/La puede inmunoprecipitar el SSA/Ro 52-kDa mientras que la mayoría de los sueros con precipitinas SSA/Ro sin anticuerpos anti-SSB/La no reaccionan con la SSA/Ro nativa de 52 kDa, pero reconoce con gran avidéz su forma desnaturalizada. Entonces, la respuesta anti-SSA/Ro es extremadamente sensible a la conformación del SSA/Ro y a la presencia de anticuerpos anti-SSB/La; esto está ampliamente restringido a la forma nativa del SSA/Ro de 60 kDa y a la forma desnaturalizada del SSA/Ro de 52 kDa.(42) Pourmand *et al.* encontraron que, en el suero AAN negativo de 64 pacientes con sospecha de enfermedad del tejido conectivo, los anticuerpos hacia Ro52 fueron el hallazgo más frecuente.(19) Se ha propuesto a la apoptosis como influencia en el mecanismo de autoinmunidad de Ro/La en tres niveles: el inicio de la autoinmunidad, la diversificación del repertorio de autoanticuerpos, y la lesión tisular mediada por autoanticuerpos.

El hallazgo clave de que los autoantígenos intracelulares están unidos en inclusiones en la membrana en la superficie de queratinocitos apoptóticos ha llevado a la propuesta de que las células apoptóticas sirven como fuente de inmunógeno intracelular para la producción de anticuerpos antinucleares. Los polipéptidos Ro y La redistribuidos pueden presentar neoepítopes durante la apoptosis vía modificaciones moleculares como oxidación, anclaje proteolítico o cambios conformacionales. En individuos susceptibles genéticamente, la generación de epítopes no toleradas de Ro y La pueden iniciar una respuesta autoinmune, particularmente en situaciones de gran apoptosis celular, o donde el aclaramiento de células apoptóticas se ve alterado. Se ha demostrado que el antígeno La sufre anclaje proteolítico durante la apoptosis resultando en pérdida de la localización de señal nuclear y acumulación en el citoplasma. Se ha propuesto como hipótesis que el sitio de los glucosaminoglucanos (GAG) en el epítope de La de la terminación carbonilo (COOH) (hacia delante del sitio de anclaje) interactúa con proteínas accesorias para exportar a La hacia la porción externa de la membrana celular apoptótica. Un potencial candidato es la anexina I, una proteína de unión a GAG que es reclutada del citoplasma hacia la superficie celular durante la apoptosis. Ro60 no se ancla durante la muerte celular. Grp78, que se sabe que actúa como adyuvante de las células TCD4fl de ayuda, colocaliza con Ro52 y Ro60 en inclusiones apoptóticas y se une con ambos en experimentos de diseminación de epítopes. Mientras una interacción física directa entre Grp78, Ro52 y Ro 60 queda por demostrarse, Ro52 y Ro60 pero no La contiene potenciales sitios de unión a Grp78.(47) Muchas de las características de LES han sido demostradas que correlacionan con anticuerpos anti-SSA/Ro: fotosensibilidad aumentada, positividad a factor reumatoide y mayor involucro renal. Hedgpeth *et al.* insistía que los anticuerpos anti-SSA/Ro son hallados de forma frecuente en neumonitis intersticial en pacientes con LES.(1, 10, 19, 42) La fuerte asociación de los anti-SSA/Ro con ciertas manifestaciones clínicas sugieren que estos anticuerpos pueden precipitarse en el desarrollo del daño tisular.(42) Se ha acumulado evidencia que sugiere que los anticuerpos anti-SSA/Ro tienen una alta asociación con dos subentidades de LES: lupus eritematoso cutáneo subagudo y lupus eritematoso neonatal (SCLE y NLE por sus siglas en inglés, respectivamente).(31, 42, 46) La especificidad de los anti-Ro52 es frecuente en enfermedades hepáticas autoinmunes. La enfermedad celiaca también está asociada con anticuerpos anti-Ro52; así mismo, está asociado con artropatía deformante no erosiva (artropatía de Jaccoud) en pacientes con LES.(1) Una gran proporción de LES y síndrome de Sjögren con anti-SSA/Ro positivo poseen fenotipo ya sea HLA-DR2 y/o HLA-DR3.(48) Los anticuerpos anti-SSA/Ro son un hallazgo raro en sujetos normales, o en pacientes con enfermedades no reumáticas.(49)

Los anticuerpos anti-ENA (anti-U1-RNP, Sm, Ro/SSA, y La/SSB) no son medidos de forma rutinaria en diferentes etapas de seguimiento de la enfermedad, a pesar de sus numerosas asociaciones clínicas significativas.(50) En los pacientes con miopatías inflamatorias idiopáticas, la presencia de anticuerpos contra SSA/Ro52 se asocia con anticuerpos anti-Jo1. A principios de 1980, diversos estudios documentaron una asociación estrecha entre anticuerpos anti-SSA/ro y SSB/La maternos con el bloqueo cardíaco congénito. Es bien sabido que los anticuerpos anti-SSA/Ro son arritmogénicos para el corazón fetal y juegan un papel crucial en el desarrollo del bloqueo cardíaco congénito (BCC), un paradigma modelo de la autoinmunidad adquirida de forma pasiva, pero no está claro si esto es también cierto para el corazón adulto(1); se cree que la lesión tisular en el BCC está mediada por la unión de los anticuerpos anti-Ro/La maternos con células apoptóticas en el corazón fetal en desarrollo. Los anticuerpos anti-La cruzan la placenta y forman complejos IgG-células apoptóticas en el corazón fetal en un modelo de transferencia pasiva, y la opsonización de cardiocitos apoptóticos por anti-Ro/La del tipo IgG *in vitro* inhibe su aclaramiento fisiológico. De forma subsecuente, un modelo de lesión tisular mediado por anti-Ro/La en BCC ha sido propuesto en donde los anticuerpos anti-Ro/La maternos se unen a células apoptóticas durante el remodelamiento embrionario del corazón fetal. Estas células expresan apotopes (definidos como epítopes expresados en la superficie de células apoptóticas), y pueden inhibir el aclaramiento fisiológico de cardiocitos apoptóticos por cardiocitos residentes, resultando en una acumulación exagerada de células apoptóticas opsonizadas.(2, 47, 51) Distintos trabajos muestran que la mayoría de los pacientes con artritis reumatoide y anti-Ro comparten las mismas características extraarticulares, como síndrome

sicca, fotosensibilidad, púrpura, leucopenia y reducción de los factores del complemento. Otros autores sugieren una asociación estrecha entre los anticuerpos anti-Ro y el desarrollo tardío de LES, definido como una enfermedad con desarrollo de síntomas después de los 50 años de edad. Esta subcategoría especial de LES, generalmente se considera una enfermedad benigna, se caracteriza por aumento en la prevalencia de características neurológicas, enfermedad intersticial pulmonar, anticuerpos anti-Ro y anti-La, y baja frecuencia de involucro renal.(45) Esta política está basada generalmente en la suposición de que el estado de anticuerpos anti-ENA no varía de forma significativa con el curso de la enfermedad en los pacientes.(50) La evidencia disponible sugiere que hay una heterogeneidad bioquímica, inmunológica y genética significativas de proteínas antigénicas SSA/Ro. Varias técnicas han sido utilizadas para detectar anticuerpos anti-SSA/Ro en el suero. Los ensayos de inmunoprecipitación en agarosa, tales como la inmunodifusión doble y la contraelectroforesis (CIE), en virtud de su simplicidad y confiabilidad, han ganado amplia aceptación para la evaluación de rutina de pacientes con enfermedades autoinmunes. Recientemente, se han desarrollado gran número de EIA para la detección de anti-SSA/Ro.(44) Blomberg *et al.* compararon el ELISA, que contenía ambas subunidades de SSA/Ro, con un IFI-AAN de rutina (usando células HEp-2 como sustrato) por su capacidad de detectar autoanticuerpos SSA/Ro en el suero de los pacientes; el hallazgo principal en este estudio fue que un número sustancial de pacientes con anticuerpo a anti-SSA/Ro, determinados por ELISA, no son detectados por IFI-AAN que utiliza células HEp-2.(31) Por lo tanto, debe ser enfatizado que la detección de anti-SSA/Ro por ELISA (o por cualquier otro método específico para su detección) en IFI-AAN negativos no indica que el paciente tenga lupus cutáneo o LES pero sí orienta a estos diagnósticos que deben ser basados de forma importante en los signos y síntomas de los pacientes. Los ensayos de IFI que utilizan células HEp-2000 (a las que se incluyen SSA/ro de 60 kDa) mostraron mejor sensibilidad (71%-91%) y altos PPV comparados con el IFI en células HEp-2. De cualquier forma, utilizando este método no se pueden detectar anticuerpos anti-Ro52. Los ensayos de precipitación de RNA mostraron la sensibilidad y especificidad más alta para detectar anti-SSA/Ro y anti-SSB/La; por lo tanto, se le considera como el estándar de oro por diferentes autores. La CIE mostró alta sensibilidad (89%) y especificidad (100%) para detectar anticuerpos anti-SSA/Ro; de hecho se considera como uno de los métodos más confiables, incluso mejor que el ELISA.(45)

Dependiendo del ensayo realizado y de cómo se seleccionen los pacientes, la evidencia muestra que del 40% a más del 90% de los pacientes con síndrome de Sjögren tiene autoanticuerpos anti-SSA/Ro, y que del 20% al 50% tienen autoanticuerpos anti-SSB/La. Ambos autoanticuerpos también pueden ser detectados en 10%-50% de los pacientes con LES; son menos frecuentes en pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo.(52) La confiabilidad de estos ensayos depende de la pureza, así como del contenido relativo de epítopes de la preparación de antígenos. Se ha utilizado la inmunotransferencia utilizando diversas fuentes de antígenos, incluyendo extractos citoplasmáticos de líneas celulares cultivadas, eritrocitos y preparaciones de purificados bioquímicos de SSA/Ro.(44)

En nuestro hospital hemos encontrado una gran cantidad de pacientes que han sido evaluados para la detección de AAN en presencia de manifestaciones sugestivas de enfermedades reumatológicas y a quienes se les ha solicitado, de manera conjunta, anticuerpos anti-ENA con el objetivo de minimizar el tiempo entre el diagnóstico y el inicio del tratamiento. Dichos pacientes han presentado AAN negativos con ENA positivos, principalmente SSA/Ro. Debido a lo ya mencionado en relación a la importancia de los anticuerpos anti-SSA/Ro y su relación con enfermedades reumatológicas, hemos decidido evaluar la sensibilidad de la prueba que utilizamos (IFI-ANA con células HEp-2) para la detección de estos pacientes, ya que en teoría la sensibilidad es alrededor del 95%. Cabe destacar que las últimas recomendaciones del ACR son solicitar a manera de escrutinio AAN exclusivamente, y de resultar positivos continuar en un segundo tiempo la evaluación con los anti-ENA. Nosotros consideramos que dicha práctica puede llevar al subdiagnóstico de un gran número de pacientes.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio es obtener la sensibilidad de los AAN para la detección de anti-SSA y compararla con la sensibilidad reportada en la literatura.

HIPÓTESIS

La sensibilidad de los AAN para detectar anticuerpos anti-SSA es menor a la reportada en la literatura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se revisaron los estudios inmunológicos de Quest Diagnostics del Hospital Ángeles Lomas durante el periodo de enero de 2010 hasta diciembre de 2014. Se incluyeron los resultados de pacientes que tuvieran resultados, ya fuera positivos o negativos, de AAN (cualquier título) y de anti-SSA; se excluyeron todos aquellos resultados en los que faltara alguno de los dos valores. Se obtuvo la sensibilidad y especificidad de los AAN para la detección de anti-SSA y se reportaron y compararon con la literatura internacional.

RESULTADOS

Se revisaron 900 pruebas inmunológicas de Quest. Se realizaron tanto AAN como anti-SSA en 499 pacientes, de los cuales 71 pacientes (14.22%) tenían anti-SSA positivos; de estos, 33 pacientes (46.47%) tenían AAN positivos y 38 pacientes (53.53%) tenían AAN negativos. La sensibilidad utilizando el corte de 1:160 fue de 57.7%; al considerar los AAN de cualquier valor como positivos, la sensibilidad aumentó a 77.5%.

Tabla 1. Sensibilidad tomando en cuenta AAN \geq 1:160 como positivo.

	Anti-SSA positivo	Anti-SSA negativo	
AAN positivo	41	47	88
AAN negativo	30	381	411
	71	428	499

Sensibilidad= 57.7%

Tabla 2. Sensibilidad tomando en cuenta AAN de cualquier título como positivo.

	Anti-SSA positivo	Anti-SSA negativo	
AAN positivo	55	86	141
AAN negativo	16	342	358
	71	428	499

Sensibilidad= 77.5%

DISCUSIÓN

De acuerdo a las guías del Colegio Americano de Reumatología (ACR, por sus siglas en inglés), al evaluar a un paciente en el que se sospecha una enfermedad reumatológica, se debe de solicitar AAN como primer paso. Si los AAN son negativos, no se debe solicitar ningún otro laboratorio, ya que la sensibilidad reportada de los AAN es de 95%. Esta recomendación está basada en costo más que en evidencia, ya que no se somete al paciente al gasto en otros anticuerpos cuando los AAN sean negativos (a menos que la sospecha sea alta) y no existen estudios que conozcamos que validen esta recomendación. En nuestro estudio reportamos una sensibilidad del 57.7% de la prueba de AAN por IFI si se toman los AAN con títulos \leq 1:80

como negativos (de acuerdo a lo reportado en varias series); si tomamos cualquier título de AAN como positivo, la sensibilidad sube un poco pero sin llegar a lo reportado en la literatura internacional. Según nuestros resultados, al mantener un estricto apego a las recomendaciones del ACR, se podrían subdiagnosticar en un 42.3% (o el 22.5%, dependiendo de los títulos que se tomen como positivos de AAN) enfermedades reumatológicas en pacientes a los que sólo se les solicitan AAN. La sensibilidad de la prueba encontrada por nosotros la hace una mala prueba de escrutinio al valorar a pacientes con sospecha de enfermedades reumatológicas con Anti Ro/SSA positivo.

La medición de los anticuerpos está afectada por el uso de Hep-2 o Hep-2000 ya que ésta última contiene más sustrato para la detección de anticuerpos anti RO/SSA, incrementando con esto la sensibilidad de la prueba al utilizar dicho sustrato. Sin embargo, es una línea celular que no se utiliza de forma cotidiana (los resultados reportados en nuestro estudio son de Quest Diagnostics que utiliza células Hep-2) y las sensibilidades reportadas en la literatura son en células Hep-2.

Otro aspecto importante a considerar es el punto de corte de positividad de los AAN. La literatura internacional considera como positivos los valores de AAN $\geq 1:160$ y por debajo de ellos no se continúa el estudio del paciente. En nuestro estudio observamos pacientes con títulos menores de los considerados positivos con presencia de otros anticuerpos, lo que disminuye la sensibilidad de la prueba; a pesar de tomar cualquier título como positivo, encontramos una sensibilidad muy baja para apoyar el uso de AAN como prueba de escrutinio para la detección de anticuerpos anti Ro/SSA.

Como limitante de nuestro estudio, no pudimos corroborar que todos los pacientes con anticuerpos anti Ro/SSA positivos tuvieran un diagnóstico clínico de enfermedad reumatológica autoinmune sin embargo como se mencionó previamente, presencia de anti Ro/SSA es muy rara en individuos sanos.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a nuestras observaciones, los AAN realizados con metodología Hep-2 tienen una sensibilidad más baja que la reportada por la literatura internacional, siendo poco eficiente como prueba de escrutinio para valorar a los pacientes en los que se sospechan enfermedades reumatológicas asociadas a anticuerpos anti Ro/SSA. Este estudio pone en cuestionamiento el algoritmo propuesto por la literatura.

FUENTES DE INFORMACIÓN

- (1) Defendenti C, Atzeni F, Spina MF, Grosso S, Cereda A, Guercilena G, Bollani S, Saibeni S, Sarzi Puttini P, Clinical and laboratory aspects of Ro/SSA-52 autoantibodies *Autoimmunity Reviews* 2011;10:150–154.
- (2) Routsias JG, Tzioufas AG, B-cell epitopes of the intracellular autoantigens Ro/SSA and La/SSB: Tools to study the regulation of the autoimmune response. *Journal of Autoimmunity* 35 (2010) 256e264.
- (3) Muro Y. Antinuclear antibodies. *Autoimmunity* 2005;38:3-9.
- (4) Ghosh P, Dwivedi S, Naik S, Agarwal V, Verma A, Aggarwal A, Misra R, Antinuclear antibodies by indirect immunofluorescence : Optimum Screening Dilution for Diagnosis of Lupus Erythematosus *Ind J Med Res*; Jul 2007; 126,34-38.
- (5) Kavanaugh A, Tomar R, Rveille J, *et al.* Guidelines for Clinical Use of the Antinuclear Antibody Test and Tests for Specific Autoantibodies to Nuclear Antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:71-81.
- (6) Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH, Evidence-Based Guidelines for the Use of Immunologic Tests: Antinuclear Antibody Testing *Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research)* Vol. 47, No. 4, August 15, 2002, pp 434–444.

- (7) Almeida-González D, Cabrera de León A, del Cristo-Rodríguez-Pérez M, *et al.* Efficiency of different strategies to detect autoantibodies to extractable nuclear antigens. *J Immunol Meth* 2010;360:89-95.
- (8) Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol.* 2000;53:424–432.
- (9) Nossent H y Rekvig OP. Antinuclear antibody screening in this new millennium: farewell to the microscope?. *Scand J Rheumatol* 2001;30:123-6.
- (10) Sugisaki K, Takeda I, Kanno T, *et al.* An anti-nuclear antibody-negative patient with systemic lupus erythematosus accompanied with anti-ribosomal P antibody. *Intern Med* 2002;41:1047-51.
- (11) Almeida-González D, Cabrera-de Leon A, Rocés-Varela A, García-García M, de Sequera-Raholae M, Rodríguez-Pérez MC, González-Hernández A, Falcón-Falcón MJ, Brito-Díaz B, Autoantibody detection with indirect immunofluorescence on HEp-2 cells: Starting serum dilutions for systemic rheumatic diseases *Immunology Letters* 140 (2011) 30– 35
- (12) López-Hoyos M, Rodríguez-Vlaverde V, Martínez-Taboada V, Performance of Antinuclear Antibody Connective Tissue Disease Screen *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1109: 322–329 (2007)
- (13) Mahler M y Fritzler MJ. The Clinical Significance of the Dense Fine Speckled Immunofluorescence Pattern on HEp-2 Cells for the Diagnosis of Systemic Autoimmune Diseases. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:1-6.
- (14) Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, Autoantibody Detection Using Indirect Immunofluorescence on HEp-2 Cells *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1173: 166–173 (2009).
- (15) Bayer PM, Bauerfeind S, Bienvenu J, *et al.* Multicenter Evaluation Study on a New HEp-2 ANA Screening Enzyme Immune Assay. *J Autoimmun* 1999;13:89.93.
- (16) Hoffman IEA, Peene I, Veys EM, De Keyser F, Detection of Specific Antinuclear Reactivities in Patients with Negative Anti-nuclear Antibody Immunofluorescence Screening Tests *Clinical Chemistry* 2002; 48:12 2171–2176
- (17) Gniewek RA, Stites DP, McHugh TM, *et al.* Comparison of Antinuclear Antibody Testing Methods: Immunofluorescence Assay versus Enzyme Immunoassay. *Clin Diagn Lab Immun* 1997;4:185-88.
- (18) Cross LS, Aslam A, Misbah SA. Antinuclear antibody-negative lupus as a distinct diagnostic entity — does it no longer exist? *QJM* 2004;97:303-8.
- (19) Pourmand N, Blomberg S, RoÈnblom 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±23
- (20) Reichlin M, ANA negative systemic lupus erythematosus sera revisited serologically *Lupus* 2000 9: 116
- (21) Provost TT, Reichlin M, Antinuclear antibody- negative systemic lupus erythematosus I. Anti-Ro(SSA) and anti-La(SSB) antibodies *J Am Acad Dermatol* 4:84-89, 1981.
- (22) Ippolito A, Wallace DJ, Gladman D, Fortin PR, Urowitz M, Werth V, Costner M, Gordon C, Alarcón GS, Ramsey-Goldman R, Maddison P, Clarke A, Bernatsky S, Manzi S, Bae SC, Merrill JT, Ginzler E,
- (23) Sjöwall C, Sturm M, Dahle C, Bengtsson AA, Jönsen A, Sturfelt G, Skogh T, Abnormal Antinuclear Antibody Titers Are Less Common Than Generally Assumed in Established Cases of Systemic Lupus Erythematosus *J Rheumatol* 2008;35:1994-2000
- (24) Moorhead SR, Lee AS, ANA negative systemic lupus erythematosus. *BJP* 1994, 164:682-683.
- (25) Van Blerk M, Van Campenhout C, Duchateau J, *et al.* Current practices in antinuclear antibody testing: results from the Belgian External Quality Assessment Scheme. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:102-108.
- (26) Ozdemir FN, Elsurur R, Akcay A, Ozdemir BH, Sezer S, Kuscu E, Haberal M, Seronegative systemic lupus erythematosus: etiology of nephrotic syndrome and acute renal failure in early postpartum period *Lupus* 2005 14: 629
- (27) Wanchu A. Clinical utility of antinuclear antibodies: titrating the serum first. *Indian J Med Res* 2007;126:10-11.

- (28) Volkmann RN, Taylor M y Ben-Artzi A. Using the Antinuclear Antibody Test to Diagnose Rheumatic Diseases: When Does a Positive Test Warrant Further Investigation?. *Southern Med J* 2012;105:100-104.
- (29) Ulvestad E, Kanestrem A, Madland TM, THOMASSEN E, Haga HJ, Vollset SE, Evaluation of Diagnostic Tests for Antinuclear Antibodies in Rheumatological Practice Scand. J. Immunol. 52, 309±315, 2000.
- (30) Bernardini S, Infantino M, Bellincampi L, *et al.* Screening of antinuclear antibodies: comparison between enzyme immunoassay based on nuclear homogenates, purified or recombinant antigens and immunofluorescence assay. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1155-60.
- (31) Blomberg S, Ronnblom L, Wallgren AC, Nilsson B, Karlsson-Parra A Anti-SSA/Ro Antibody Determination by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay as a Supplement to Standard Immunofluorescence in Antinuclear Antibody Screening Scand. J. Immunol. 51, 612±617, 2000
- (32) Maguire GA, Ginawi A, Lee J, *et al.* Clinical utility of ANA measured by ELISA compared with ANA measured by immunofluorescence. *Rheumatology* 2009;48:1013-14.
- (33) Copple SS, S. Rashelle Giles SR, Jaskowski TD, Gardiner AE, Wilson AM, Hill HR, Screening for IgG Antinuclear Autoantibodies by HEp-2 Indirect Fluorescent Antibody Assays and the Need for Standardization Am J Clin Pathol 2012;137:825-830.
- (34) Fenger M, Wiik A, Høier-Madsen M, *et al.* detection of Antinuclear Antibodies by Solid-Phase Immunoassays and Immunofluorescence Analysis. *Clin Chem* 2004;50:2141-47.
- (35) Homburger HA, Cahen YD, Griffiths J, *et al.* Detection of Antinuclear Antibodies: Comparative Evaluation of Enzyme Immunoassay and Indirect Immunofluorescence Methods. *Arch Pathol Lab Med* 1998;122:993-99.
- (36) Voigt J, Krause C, Rohwäder E, Saschenbrecker S, Hahn M, Danckwardt M, Feirer C, Ens K, Fechner K, Barth E, Martinez T, Stöcker W, Automated Indirect Immunofluorescence Evaluation of Antinuclear Autoantibodies on HEp-2 Cells Clinical and Developmental Immunology Volume 2012,
- (37) Dahle C, Skogh T, Åberg AK, *et al.* Methods of choice for diagnostic antinuclear antibody (ANA) screening Benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. *J Autoimmun* 2004;22:241-48.
- (38) González C, Guevara P, Alarcón I, *et al.* Antinuclear antibodies (ANA) screening by enzyme immunoassay with nuclear HEp-2 cell extract and recombinant agents: analytical and clinical evaluation. *Clin Biochem* 2002;35:463-69.
- (39) Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade EC Pattern on the Antinuclear Antibody–HEp-2 Test Is a Critical Parameter for Discriminating Antinuclear Antibody–Positive Healthy Individuals and Patients With Autoimmune Rheumatic Diseases Art Rheum 2011; 63: 191-200
- (40) El-Chennawi FA, Mosaad YM, Habib HM, *et al.* Comparative Study of Antinuclear Antibody Detection by Indirect Immunofluorescence and Enzyme Immunoassay in Lupus Patients. *Immunol Invest* 2009;38:839-50.
- (41) Olausson E y Rekvig OP. Screening Tests for Antinuclear Antibodies (ANA): Selective Use of Central Nuclear Antigens as a Rational Basis for Screening By ELISA. *J Autoimmun* 1999;13:95-102.
- (42) Ben-Chetrit E, The Molecular basis of the SSA/Ro Antigens and the Clinical Significance of their Autoantibodies. *British Journal of Rheumatology* 1993;32:396-402
- (43) Provost TT, Watson R, Anti-Ro(SS-A) HLA-DR3-Positive Women: The Interrelationship Between Some ANA Negative, SS, SCLÉ, and NLE Mothers and SS/LE Overlap Female Patients *J Invest Dermatol* W0A4S-20S, 199
- (44) Manoussakis MN, Kistis KG, Liu X, Aidinis V, Guialis A, Moutsopoulos HM, Detection of anti-Ro(SSA) antibodies in Autoimmune Diseases: comparison of five methods *British Journal of Rheumatology* 1993;32:449-455
- (45) F. Franceschini F, Cavanazzana I Anti-Ro/SSA and La/SSB antibodies Autoimmunity, February 2005; 38(1): 55–63

- (46) Popovic K, Brauner S, Ek M, Wahren-Herlenius M, Nyberg F, Fine specificity of the Ro/SSA autoantibody response in relation to serological and clinical findings in 96 patients with self-reported cutaneous symptoms induced by the sun *Lupus* (2007) 16, 10–17
- (47) Reed JH, Jackson MW, Gordon TP, B cell epitopes of the 60-kDa Ro/SSA and La/SSB autoantigens *Journal of Autoimmunity* 31 (2008) 263–267
- (48) Provost TT, Watson R Anti-Ro(SS-A) HLA-DR3-Positive Women: The Interrelationship Between Some ANA Negative, SS, SCLER, and NLE Mothers and SS/LE Overlap Female Patients *J Invest Dermatol* W0A4S-20S, 1993
- (49) Maddison PJ, Provost TT, Reichlin M. Serological findings in patients with “ANA-negative” systemic lupus erythematosus. *Medicine* 1981;60:87-94.
- (50) Faria AC, Karin Spat Albino Barcellos KC, Coehlo Andrade LE Longitudinal fluctuation of antibodies to extractable nuclear antigens in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2005;32;1267-1272
- (51) Reed JH, Neufing PJ, Jackson MW, Clancy RM, Macardle PJ, Buyon JP, Gordon TP Different temporal expression of immunodominant Ro60/60 kDa-SSA and La/SSB epitopes *Clinical and Experimental Immunology*, 148: 153–160
- (52) Bizzaro N, Bonelli F, Tonutti E, Tozzoli R, Villalta D, New Coupled-Particle Light-Scattering Assay for Detection of Ro/SSA (52 and 60 Kilodaltons) and La/SSB Autoantibodies in Connective Tissue Diseases *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*, Sept. 2001, p. 922–925.
- (53) Rigon A, Buzzulini F, Soda P, Onofri L, Arcarese L, Iannello G, Afeltra A, Novel opportunities in automated classification of antinuclear antibodies on HEp-2 cells *Autoimmunity Reviews* 10 (2011) 647–652.
- (54) Ulvestad E, Kanestrem A, Madland TM, THOMASSEN E, Haga HJ, Vollset SE, Evaluation of Diagnostic Tests for Antinuclear Antibodies in Rheumatological Practice *Scand. J. Immunol.* 52, 309–315, 2000.
- (55) Ghillani P, Rouquette AM, Desgruelles C, et al. Evaluation of the LIASON ANA Screen Assay for Antinuclear Antibody Testing in Autoimmune Diseases. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1109:407-413.
- (56) Sebastian W, Roy A, Kini U, et al. Correlation of antinuclear antibody immunofluorescence patterns with immune profile using line immunoassay in the Indian scenario. *Ind J Patho Microbiol* 2010;53(3):433-438.
- (57) Skogh T and Dahle C. Comment on: Clinical utility of ANA measured by ELISA compared with ANA measured by immunofluorescence. *Rheumatology* 2010;49:397-398.