

1^{er} Consenso Uruguayo de Anticuerpos Antinucleares

Natalia Rodríguez*, Celia Buzzi, Ernesto Cairoli, Luis Eduardo Coelho Andrade, Álvaro Danza, Cecilia Montenegro, Raquel Ballesté
Hospital de Clínicas Departamento de Laboratorio Clínico
Hospital de Clínicas Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas
Hospital Pasteur Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas
Universidad Federal de San Pablo. Escuela Paulista de Medicina. División de Reumatología

Palabras clave: Anticuerpos antinucleares
Consenso
Uruguay

Key words: Antinuclear antibodies
Consensus
Uruguay

1. Introducción

Los anticuerpos antinucleares (ANA) están presentes en una gran cantidad de enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS), siendo un estudio muy solicitado en la práctica clínica, así como una técnica de alta demanda en los laboratorios clínicos. Si bien en la última década ha habido un gran esfuerzo regional e internacional para consensuar y estandarizar la prueba, en nuestro país los laboratorios presentan disparidad en cuanto a las técnicas utilizadas y a la dilución inicial de tamizaje. Así mismo, en la práctica clínica, la indicación de la prueba muchas veces no se encuentra bien dirigida. En el Congreso Uruguayo de Patología Clínica del 2016 se dictó un Curso de Educación Médica Continua sobre el Uso de los ANA y se reconoció una vez más la necesidad de uniformizar las prácticas tanto clínicas como de laboratorio en torno a la prueba. Con el afán de generar un 1^{er} Consenso Uruguayo sobre ANA se conformó un grupo directivo de trabajo para discutir acerca de los temas a consensuar.

2. Metodología empleada

La metodología del presente consenso está basada en el Método de elaboración de recomendaciones de buenas prácticas del máximo organismo estatal de salud de Francia⁽¹⁾.

Dicha metodología fue seleccionada por el grupo directivo por contar con las siguientes fortalezas: presenta como objetivo primordial realizar un pequeño número de recomendaciones que serán concisas, basadas en el acuerdo de expertos y en la literatura disponible según el nivel de evidencia, dando respuesta a las preguntas formuladas; está conformado por tres grupos de trabajo: Grupo directivo, de votación y de redacción o revisor; establece la independencia del grupo directivo con el grupo de votación y, por último, no busca convergencia de opiniones durante las reuniones del grupo directivo.

El presente consenso posee algunas diferencias metodológicas con respecto al método de HAS, a saber: La

* Coordinación general. Correo electrónico: nathor.nat@gmail.com.

Integrantes del Grupo de Votación: Fernando Antúnez (Montevideo), Cecilia Brito (Montevideo), Gianella Cabrera (Florida), Sandra Consani (Montevideo), Karina Flores (Montevideo), Ana Luisa González (Montevideo), Marineé González (Montevideo), Aranzazú Iguain (Montevideo), Mercedes Menéndez, Franco Pacello (Paysandú), Fernando Rivero (Florida), Ricardo Robaina (Montevideo), Marcela Rodríguez (Salto), Fernanda Sánchez (Montevideo), Martín Yandian (Montevideo).

Integrantes del Grupo de Revisión: Fernanda Alonso, Esther Araujo, Yolanda Arioli, Bettina Cabana, Cecilia Collazo, Laura Domínguez, Viviana Domínguez, Alejandro Fernández, Diego Graña, Natalia Menéndez, Silvia Pigni, Paolo Ponte, Ana Richieri, Martín Rebella, Federico Roca, Cristina Servetto, Inés Silva, Ricardo Silvariño, Ángela Soba, Mariana Testuri, Beatriz Xavier, Laura Yametti.

Integrantes del Grupo de Referentes: Uruguay: Adriana Bérez, Luis Borche, Carlos Krul, Enrique Méndez. España: Ricard Cervera. México: Ignacio García de la Torre. Argentina: Bernardo Pons-Estel y Guillermo Pons-Estel.

Correspondencia: Dra. Natalia Rodríguez, Depto. Laboratorio Clínico-Replicación Inmunología, Hospital de Clínicas "Dr. Manuel Quintela", Av. Italia s/n, CP: 11600., Montevideo, Uruguay. Correo electrónico: nathor.nat@gmail.com

creación de un cuarto Grupo de referentes o expertos (cuatro integrantes nacionales y cuatro internacionales), realización de dos encuestas no presenciales (una al grupo de votación y otra al grupo de revisión y referentes), seguidas de una reunión final presencial entre todos los grupos de trabajo (excepto el grupo de expertos internacionales). Las recomendaciones surgen de aquellas afirmaciones que tuvieron acuerdo en la encuesta al grupo de votación, incluyendo enmiendas sugeridas por el grupo de expertos.

En dos reuniones del grupo directivo, llevadas a cabo en agosto del año 2018, se resolvió trabajar en seis puntos controvertidos:

- Nombre de la prueba
- Indicaciones
- Técnica de tamizaje
- Dilución inicial de tamizaje
- Informe del resultado
- Utilidad de los anticuerpos antinucleares en el diagnóstico.

Y se definió los participantes del grupo de votación, de revisión, y se propuso un grupo de referentes, teniendo como objetivo incluir a la mayor cantidad de profesionales involucrados en el procesamiento, validación e interpretación de la prueba de ANA, así como la mayor representación posible de laboratorios del interior del país donde se realiza la prueba.

El grupo directivo realizó una primera encuesta al grupo de votación a través de una plataforma digital (SurveyMonkey) con 26 afirmaciones, acompañada de un resumen bibliográfico adjunto basado en una revisión sistemática y una síntesis de la literatura sobre cada tema a consensuar. Cada afirmación debía ser ponderada con una escala numérica del 1 al 9, siendo 1 desacuerdo total y 9 acuerdo total. Posteriormente se analizaron las respuestas, obteniéndose la mediana de cada una. Se evaluaron según el criterio de puntajes establecido en la metodología utilizada: puntajes del 1 al 3 indican no acuerdo, del 4 al 6 indican indecisión y del 7 al 9 indican acuerdo (cuadro 1).

En una instancia posterior se realizó una segunda encuesta, esta vez dirigida al grupo de revisión y al de referentes nacionales, compuesta por las 17 afirmaciones que obtuvieron acuerdo en la primera encuesta, con el propósito de dar una opinión formal sobre el contenido de la versión inicial de las recomendaciones, en particular su aplicabilidad, aceptabilidad y comprensibilidad.

El día 21 de noviembre, en el marco del XVII Congreso Uruguayo de Patología Clínica, se realizó una Jornada del 1^{er} Consenso Uruguayo de Anticuerpos Antinucleares, donde se expusieron los resultados a los gru-

pos de votación, revisión y de referentes nacionales, y se incluyeron las enmiendas que surgieron de la reunión. Se redactaron tres documentos: la argumentación científica de la bibliografía consultada (resumen bibliográfico), el documento completo del consenso con las recomendaciones finales y una ficha de síntesis. Por último, en el mes de diciembre se enviaron los documentos vía correo electrónico al grupo de referentes internacionales para su revisión final.

3. Nombre de la prueba

- El nombre más adecuado para denominar la prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2 es anticuerpos antinucleares.
- El nombre más adecuado para denominar la prueba de ANA por IFI sobre células HEp-2 es anticuerpos antinúcleo-citoplasma (ANA).
- El nombre más adecuado para denominar la prueba de ANA por IFI sobre células HEp-2 es anticuerpos anticelulares (ANA).

Desde su incorporación en el algoritmo de estudio de las enfermedades autoinmunes, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2 ha sido denominada como ANA (del inglés anti-nuclear antibody) o FAN (factor antinúcleo) para hacer referencia a la misma, ya sea desde la solicitud de parte del médico clínico o a la hora de emitir el informe por parte de los laboratorios. Esta denominación, tal cual lo indica su nombre, se limitaría a la reactividad objetivada frente a antígenos presentes en las estructuras del núcleo exclusivamente, excluyendo los patrones de fluorescencia por reactividad frente a otras estructuras celulares, ya sean citoplasmáticas, del aparato mitótico, de membrana, etc. Además, las células HEp-2 permiten reconocer anticuerpos dirigidos contra estructuras proteicas expresadas en diferentes fases del ciclo celular, como proteínas del centrómero (por ejemplo, CENP-F), contra antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) y otras.

Por lo tanto, si bien esta terminología es por un lado específica, a lo largo del tiempo ha sido utilizada de un modo genérico, sin un acuerdo concreto, a la hora de referirse a otros patrones de fluorescencia no nucleares. Esta falta de acuerdo entre los laboratorios deja librado a quien realiza el informe la manera de cómo comunicar estos otros patrones no nucleares, sobre todo citoplasmáticos, y a la interpretación de quien recibe la información que abarca un resultado negativo.

Este aspecto ha sido considerado a nivel internacional y regional por diferentes grupos de expertos⁽²⁻⁴⁾.

En agosto de 2008 se llevó a cabo en Buenos Aires el Primer Consenso Argentino para la Estandariza-

Tabla 1. Nuevas denominaciones recomendadas para la prueba de ANA. (Adaptado de Dellavance A., et al. II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2)(5).

1. FAN – Búsqueda de anticuerpos contra componentes del núcleo, nucléolo, citoplasma y aparato mitótico.
2. FAN Búsqueda de autoanticuerpos.
3. Búsqueda de autoanticuerpos (antinucleares y citoplasmáticos).
4. Búsqueda de anticuerpos contra componentes del núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma y aparato mitótico.
5. Búsqueda de autoanticuerpos – núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma y aparato mitótico.
6. Búsqueda de autoanticuerpos contra antígenos intracelulares (FAN).

ción de la determinación de ANA por IFI-HEp-2, con la participación de 28 expertos. Se discutieron los aspectos metodológicos más importantes y se decidió llamar a la determinación “anticuerpos anti núcleo-citoplasmáticos” (FAN/ANA), considerando que es el nombre más explicativo y adecuado, aclarando entre paréntesis (FAN/ANA), siglas con las que se identifica esta determinación en español y que están referidas a factor antinuclear/anticuerpos anti-nucleares⁽³⁾.

Por otro lado, en 2003 el II Consenso Brasileiro consideró que la terminología tradicional de FAN debía ser sustituida por una denominación que contemplara la detección de anticuerpos contra todos los constituyentes celulares, y no solo contra los antígenos nucleares, incorporando a la sigla FAN las otras determinaciones realizadas en el examen, definiendo seis opciones posibles para ser utilizadas por los laboratorios en sus informes (tabla 1)⁽⁵⁾.

Las recomendaciones italianas del Forum Interdisciplinare per la Ricerca nelle Malattie Autoimmuni (FIRMA) establecen explícitamente que un patrón citoplasmático debe considerarse ANA positivo (<http://www.gruppofirma.com>). Ni la ACR ni las recomendaciones EASI/IUIS establecen una posición clara hacia los patrones de citoplasma/aparato mitótico que se consideran ANA negativos o positivos. La recomendación EASI/IUIS solo establece que “además de los patrones nucleares, también se deben informar y especificar los patrones citoplasmáticos y de los aparatos mitóticos cuando sea posible”. Finalmente, el Grupo de estudio europeo de búsqueda de consenso sobre investigación de laboratorio en reumatología (ECGSG), que forma parte de la Liga europea contra el reumatismo (EULAR), considera un patrón citoplasmático como ANA negativo (comunicación personal, Johan Rönnelid, Suecia)⁽²⁾.

Tabla 2. Entidades que pueden asociarse con positividad de anticuerpos antinucleares (adaptada de Among-Levin N, et al)⁽¹²⁾.

- Lupus eritematoso sistémico
- Lupus inducido por fármacos
- Esclerosis sistémica (difusa/limitada)
- Fenómeno de Raynaud
- Síndromes de solapamiento
- Enfermedad mixta del tejido conectivo
- Síndrome de Sjögren
- Enfermedad indiferenciada del tejido conectivo
- Artritis idiopática juvenil
- Artritis reumatoide
- Miopatías inflamatorias/Dermatomiositis
- Colangitis biliar primaria
- Hepatitis autoinmune
- Síndromes linfoproliferativos
- Infecciones: endocarditis, neumonía (*Mycoplasma*)
- Tiroiditis autoinmune
- Enfermedad celíaca

4. Indicaciones

- Los ANA orientan a enfermedad autoinmune sistémica (EAS) y deben solicitarse solo en los casos de cuadro clínico sugestivo de ésta.
- Los ANA orientan a EAS y su solicitud debe ser el final de un proceso de descarte de otras entidades.

Los ANA son de gran utilidad en el diagnóstico y clasificación de las enfermedades autoinmunes sistémicas (EAS)⁽⁶⁾. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que existen ciertas consideraciones fundamentales: hay pacientes sin EAS que tienen ANA positivos (a diferentes títulos); las EAS son relativamente poco frecuentes en la población general; muchos pacientes con ANA positivos no desarrollarán una EAS en la evolución⁽⁷⁾.

Las ANA son frecuentes en el lupus eritematoso sistémico (LES) (96,5%), síndrome de Sjögren (SSj), esclerosis sistémica (ES), miopatías inflamatorias (MI) (63%), enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC), hepatopatías autoinmunes (HAI), entre otras^(8,9). Diversos trabajos han mostrado una frecuencia variable de títulos positivos de ANA en la población general. En un estudio

Tabla 3. Síntomas orientadores de enfermedad autoinmune sistémica.

- Artritis
- Lesiones cutáneas características
- Rush (brote) cutáneo fotosensible
- Ojo/boca seca
- Poliserositis
- Alopecia
- Sedimento urinario patológico (en particular, leucocitos, glóbulos rojos, proteinuria, cilindros)
- Citopenias
- Recién nacido con bloqueo auriculoventricular
- Fiebre de origen desconocido descartadas las causas infecciosas más prevalentes
- Fenómeno de Raynaud
- Síndrome miopático, descartadas las causas más frecuentes

se observó que el 31,7% de sujetos sanos tenían ANA positivos por IFI en títulos 1/40, 13,3% en títulos 1/80 y 5% en títulos 1/160⁽¹⁰⁾.

Títulos positivos de ANA por IFI pueden detectarse en pacientes con diversas patologías. En el LES presentan una sensibilidad muy elevada, cercana a 98%, pero una especificidad más baja, entorno al 60%. Por lo tanto, es razonable que se planteen como el primer estudio a realizar si la sospecha clínica de LES es elevada. En el caso de la ES, la sensibilidad es de 85% y la especificidad de 54%, mientras que en el grupo de las MI la sensibilidad cae a 61% y la especificidad a 63%⁽¹¹⁾.

Asimismo, los ANA pueden ser positivos en otras enfermedades autoinmunes, enfermedades oncológicas e infecciosas (tabla 2)⁽¹²⁾. La interpretación debe ponderar varios aspectos, la presentación clínica, incluyendo la edad, la sintomatología y la carga de morbilidad asociada de cada caso en particular, los títulos y el patrón informado por el laboratorio. Es probable que el valor predictivo positivo (VPP) sea mayor en la medida en que los títulos son más elevados⁽¹³⁾. Por su parte, las mujeres jóvenes tienen más riesgo de presentar títulos positivos de ANA en relación con los hombres mayores, así como los pacientes que presentan autoanticuerpos antitiroglobulina y anticuerpos antigliadina⁽¹⁴⁾.

El desafío consiste en estudiar los ANA en aquellos pacientes que tienen una clínica compatible o sugestiva de una EAS, evitando hacer *screening* de autoinmunidad en casos no justificados. Para ello, es deseable hacer un correcto interrogatorio y examen clínico, estable-

ciendo la probabilidad pretest de presentar una EAS. En la tabla 3 se describen las manifestaciones clínicas sugestivas de la presencia de una enfermedad autoinmune para tener en cuenta en la primera consulta o en los primeros contactos con este tipo de pacientes. La sola presencia de ANA no permite realizar diagnóstico de ninguna entidad clínica⁽¹⁵⁾.

En pacientes con EAS durante la planificación de embarazo, o bien durante el embarazo, es deseable verificar la negatividad de los anticuerpos anti-SSA/Ro, dado el riesgo de bloqueo cardíaco u otras manifestaciones del lupus neonatal. Las manifestaciones cardíacas fetales y neonatales tienen relación con los anticuerpos anti-SSA/Ro (y/o anti-SSB/La), y no con la enfermedad materna, sea LES, Sjögren u otras enfermedades autoinmunes^(16,17).

5. Técnicas de tamizaje

- La técnica patrón de oro para el estudio de ANA es la IFI sobre células HEp-2.
- No se recomienda utilizar otras técnicas diferentes a la IFI como estudio inicial de ANA, porque las mismas no poseen todos los antígenos que la célula HEp-2 expresa en forma constitutiva, dando resultados falsos negativos.
- De optar por la realización de técnicas distintas a la IFI, debe aclararse en el informe la técnica utilizada y enumerar en detalle cuáles fueron los anticuerpos estudiados según la combinación de antígenos que incluya el ensayo. Ante la positividad de ANA por IFI a título significativo debe investigarse la especificidad de los anticuerpos mediante alguna de las técnicas que discriminan separadamente los mismos.
- Se han desarrollado sistemas informáticos para la lectura automatizada de las láminas que reconocen la positividad de la fluorescencia y algunos de los patrones más frecuentes. Sin embargo, como no reconocen la totalidad de los patrones descriptos hasta el momento, se recomienda que las imágenes sean revisadas a posteriori por un observador entrenado.

5.1 Desarrollo y generalización de la IFI

Pasada la época en que se reveló la autorreactividad nuclear por el descubrimiento del fenómeno LE, surge la técnica de IFI para ANA iniciada en 1957. Utilizó como sustrato cortes de tejido de rata, que luego, a partir de la década de 1970, fueron sustituidos por una línea celular en monocapa de células HEp-2 de carcinoma laríngeo humano. Estas células expresan en su núcleo y su citoplasma más de 150 antígenos, frente a los cuales reaccionan los autoanticuerpos presentes en el suero, generando patrones de fluorescencia característicos, que en algunos casos permiten reconocer hacia cuál estructura molecular

van dirigidos estos autoanticuerpos (por ejemplo, los anticentrómero, los antirribosomal p, etc.)⁽¹⁸⁾.

Es el único ensayo, entre todos los que se han comercializado, que posee tal diversidad de antígenos expresados en su forma nativa y ubicados constitutivamente en el sitio celular de origen. Esta es su principal ventaja con respecto a otro tipo de inmunoensayos en los cuales la unión covalente de las proteínas a la fase sólida afecta su conformación, eliminando algunos epitopes nativos y generando neoepitopes durante el proceso⁽¹⁹⁾.

Se le reconocen cuatro desventajas que se analizan a continuación:

La baja especificidad es debida en parte a que un número elevado de individuos sanos pueden resultar ANA positivo a título 1/40. Esto se subsana, en parte, con la propuesta de elevar el título basal para iniciar el estudio, comentado en otra sección. Consideradas las enfermedades autoinmunes en su globalidad, la positividad de los ANA a títulos significativos orienta a la existencia de alguna de ellas, descartadas las otras causas de ANA positivos. Será el patrón o la determinación posterior de la especificidad antigénica, sumados al cuadro clínico, los elementos que llevarán a la orientación diagnóstica. Para esto se recomienda a posteriori la realización de otro tipo de técnicas que más que confirmatorias serían discriminatorias, porque investigan específicamente la molécula blanco o target hacia la cual van dirigidos los autoanticuerpos, pudiendo ser inmunoblots, inmunodots, ELISAs, ensayos con esferas fluorescentes o de quimioluminiscencia, etc.⁽¹²⁾.

La laboriosidad y el tiempo insumido en su realización son un inconveniente en los laboratorios a gran escala, regionales, con poblaciones de cobertura numerosas que analizan un volumen muy importante de muestras. A esto se le suma el aumento de las solicitudes de ANA en los últimos años, sean estas justificadas o no, lo que hizo necesaria la automatización para optimizar los tiempos de respuesta⁽²⁰⁾. Esta desventaja debe ser ponderada en cada laboratorio según sus características, ya que para laboratorios de menor escala con personal capacitado, podría insumir más horas de la jornada laboral: el mantenimiento, la preparación, la supervisión y la finalización de un equipo automatizado, de las que insumiría realizar la técnica manualmente. Así mismo, la valoración del tiempo requerido para la observación al microscopio va a depender del volumen de muestras a informar y de la disponibilidad de personal entrenado en el medio.

La variabilidad analítica inter-laboratorios que dificulta la comparación de resultados a la hora de llevar a cabo estudios multicéntricos, derivó en la necesidad de estandarización del test. Para ello, se establecieron especificaciones en cuanto a las diluciones, el conjugado, la

lámpara, el microscopio, etc. Y se dispone de paneles de sueros de referencia para ser utilizados como controles de calidad externos, tanto comerciales como de organismos internacionales⁽⁵⁾.

La subjetividad en la lectura al microscopio es otra de las desventajas que se mencionan de la IFI y es uno de los argumentos en pos de la automatización de la lectura. En esta dirección en la introducción de las recomendaciones internacionales para el manejo de los autoanticuerpos frente a antígenos celulares llamados antinucleares, publicada en 2014, se expresa que la IFI implica experiencia técnica sustancial, y si bien se considera el patrón de oro, será tan buena como el laboratorio que la realice⁽¹²⁾. Cabe una consideración a este respecto: más allá de los métodos de medición para innumerables analitos en el laboratorio, que tienden a mejorar la precisión y la exactitud, existe también otro gran grupo de parámetros médicos subjetivos que requieren de la habilidad de un observador de morfologías, léase la citología, la histología, etc. La subjetividad no es en sí misma una desventaja cuando es correctamente aplicada. Ni qué hablar del momento del acto clínico, en el que la información recabada durante la anamnesis y el examen físico del paciente va a depender de la capacidad que tenga ese médico de detectar y reconocer los elementos fundamentales para el diagnóstico. Mediante el razonamiento clínico integrador, llegará a una conclusión acertada, valiéndose de sus conocimientos, su experiencia y también de su subjetividad.

A lo largo de los últimos años la industria fue desarrollando numerosos ensayos con la pretensión de sustituir a la IFI sobre células HEP-2 en el tamizaje de ANA, en lo que sería la segunda etapa de las técnicas.

5.2 Técnicas específicas e intento de sustituir la IFI

Estos inmunoensayos en fase sólida (Solid phase assays: SPA, por su sigla en inglés) son de diversos tipos: primero ELISA, luego ensayos con esferas fluorescentes o de quimioluminiscencia, etc. Utilizan una combinación de antígenos seleccionados por su reconocida asociación a enfermedad autoinmune sistémica mediante una mezcla de proteínas recombinantes o péptidos sintéticos unidos a la fase sólida. Algunos tienen agregado un extracto de células HEP-2.

Un grupo inglés estudió en paralelo, por dos técnicas, 89 muestras de ANA, resultando 40 positivos por ELISA (45%), mientras que 72 fueron positivos por IFI sobre HEP-2 (81%). El ELISA fue menos sensible, pero más específico para LES u otras EAS asociadas a ANA. Sin embargo, esta técnica no detectó el estándar del CDC con patrón nucleolar. Una cantidad no despreciable de estos pacientes negativos por ELISA, pero positivos por IFI HEP-2, presentaban enfermedades asocia-

das a ANA o fenómeno de Raynaud, en el cual ANA es factor pronóstico. La misma situación se describió en publicaciones en pacientes con ES, LES, o artritis idiopática juvenil⁽²⁰⁾.

Otro grupo demostró que el 54 % de los pacientes que cumplía los criterios del Colegio Americano de Reumatología (ACR) para LES y eran ANA positivos por IFI, resultaron negativos por otros inmunoensayos en fase sólida⁽¹⁹⁾.

Otro ensayo comparó tres técnicas en una población seleccionada de pacientes con diagnóstico de LES, SJS, SSc, MI y EMTC. La sensibilidad resultó de 95% para IFI con lectura automatizada, 80% para un ensayo inmunofluorescente y 86% para uno de quimioluminiscencia. La sensibilidad varía al separar el análisis por patologías, como era de esperar, dando más alta en aquellas en que los autoanticuerpos presentes van dirigidos hacia antígenos que están incluidos en los ensayos en fase sólida. Finaliza concluyendo que la combinación de IFI y ensayos en fase sólida agrega valor⁽²¹⁾.

Existen infinidad de publicaciones comparando las diferentes técnicas, expresando los resultados de forma variada y promovidas por diferentes industrias; en ninguna de ellas se concluye que se pueda prescindir de la IFI, por lo cual comienza la tercera etapa abocada a hacer de ésta una técnica más rápida y más estandarizable.

5.3 Vuelta a la IFI y automatización de la lectura

La lectura automatizada permite el reconocimiento de patrones mediante programas informáticos dotados de algoritmos matemáticos. La llamada microscopía automatizada demostró poder discriminar con exactitud entre un ANA positivo y un ANA negativo, además de reconocer algunos de los patrones hallados más frecuentemente. Sin embargo, en varias de las publicaciones que analizan estas plataformas, se sigue recomendando la verificación posterior de la lectura por un observador entrenado, debido a discordancias halladas en los informes automatizados y a que mediante estos sistemas aún no se ha logrado reconocer toda la variedad de patrones con implicancias clínicas descriptos hasta ahora^(22,23).

En una reciente publicación se brinda un listado de las múltiples plataformas disponibles comercialmente en la actualidad con el detalle de sus principales características: empresa fabricante, discriminación entre positivo/negativo, patrones reconocidos, patrones mixtos reconocidos, colorante nuclear, el número de muestras/hora, capacidad de láminas, un mismo equipo para IFI y lectura o dos, calibración, validación final del resultado, control de calidad y método de análisis de patrones⁽²³⁾.

6. Dilución inicial de tamizaje

- El título inicial adecuado en población adulta (≥ 16 años) para iniciar la búsqueda de ANA por IFI sobre células HEp-2 es 1/40.
- El título inicial adecuado en población adulta (= 16 años) para iniciar la búsqueda de ANA por IFI sobre células HEp-2 es 1/80.
- En población adulta (≥ 16 años) para iniciar la búsqueda de ANA por IFI sobre células HEp-2 es 1/160.

En un estudio se comprobó que en individuos sanos la frecuencia de ANA no difirió significativamente entre los cuatro subgrupos de edad 20-60 años. Esta población, en apariencia normal, fue ANA positivo en el 31,7% de los individuos a la dilución 1/40 del suero, 13,3% en 1/80, 5,0% en 1/160 y 3,3% en 1/320. En comparación con los resultados entre los subgrupos con enfermedad autoinmune, un bajo punto de corte a un título de 1/40 (alta sensibilidad, baja especificidad) podría tener valor diagnóstico, ya que clasificaría virtualmente a todos los pacientes con LES, SSc o SJS como ANA positivo. Por el contrario, un valor de punto de corte alto a un título de 1/160 (alta especificidad, baja sensibilidad) sería útil para confirmar la presencia de la enfermedad en solo una parte de los casos, pero probablemente excluye al 95% de individuos normales. Una pregunta fundamental, que generalmente no se aborda completamente con respecto a los autoanticuerpos en personas normales, o individuos sin manifestaciones clásicas de la enfermedad, es la importancia clínica y biológica de los anticuerpos de bajo título⁽¹⁰⁾.

En otro estudio se estableció una mayor probabilidad de presentar EAS en aquellos pacientes con diluciones más altas, ya desde su primera consulta. Estos valores mantienen la diferencia con la artritis reumatoide (AR), enfermedad de naturaleza autoinmune que presenta mayor número de pacientes entre sus muestras positivas para títulos $<1/160$. En una comparación de este nivel de titulaciones para la prueba de ANA en una unidad de reumatología con estudios previos desarrollados por otras especialidades médicas, se muestra un VPP en las conectivopatías notablemente superior, tanto en las diluciones más bajas ($>1/80 = 36\%$ vs 10%), como para diluciones altas ($>1/1.280 = 85\%$ vs $38,9\%$).

En conclusión, todos estos datos muestran el incremento de la frecuencia de ANA en títulos elevados observados por IFI desde la primera muestra en enfermedades con EAS respecto a las no EAS, estableciéndose esta asociación para diluciones $>1/320$ ⁽²⁴⁾.

Otro estudio afirma que cada laboratorio debe establecer, en individuos normales y según la edad, el valor

Tabla 4. Personas normales/Frecuencia de resultados positivos de ANA (adaptada de Kavanaugh A.)⁽²⁸⁾.

1:40	20%-30%
1:80	10%-12%
1:160	5%
1:320	3%

de corte por debajo del cual el resultado se considera negativo. Para individuos adultos, la recomendación es de ensayar la determinación en dos títulos: 1/40 y 1/160, aclarando qué porcentaje de individuos sanos dan resultados positivos a estas diluciones. Teniendo en cuenta razones económicas, se propone hacer el tamizaje a la dilución de 1/80 con una sensibilidad de 90% a 95%. En individuos más jóvenes se recomendaría una dilución de corte de 1/40⁽³⁾.

La interpretación de los resultados depende del patrón observado, el nivel de los autoanticuerpos y la edad del paciente. Los ancianos, especialmente mujeres, son propensos a desarrollar autoanticuerpos de bajo título (<1/80) en ausencia de clínica de una enfermedad autoinmune. Por el contrario, uno puede realizar los ANA de muestras de suero de pacientes más jóvenes a una dilución de 1/40⁽²⁵⁾.

El IV consenso brasilero instó a los laboratorios de Brasil al uso de la dilución de tamizaje de 1/80. Se basó en el hecho de que algunos pacientes con enfermedad autoinmune pueden tener títulos de 1/80, aunque la mayoría de ellos presentan títulos moderados (1/160 y 1/320) a altos (\geq 1/640) en el sustrato celular HEp-2, mientras que sujetos sanos tienden a tener títulos bajos (1/40 y 1/80); otro aspecto que refuerza la necesidad de esta recomendación fue el hecho de que la prueba continúa siendo solicitada por una variedad de especialistas de diversos tipos de servicios, donde son menos frecuentes las enfermedades reumáticas autoinmunes⁽²⁶⁾.

Diferentes diluciones de tamizaje: 1/40, 1/80 y 1/160 se han sugerido como valor de corte para la prueba de ANA sobre sustrato de células HEp-2. Siguiendo las recomendaciones de la ACR y el grupo de Clínicas de Colaboración del Lupus Eritematoso Sistémico (SLICC), y adoptando las directrices del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) para la definición de los intervalos de referencia de laboratorio clínico, este estudio estableció la dilución de 1/160 como título anormal o valor de referencia para el test. En conclusión, se estableció la dilución de 1/160 como el título inicial de ANA-HEp-2. Por lo tanto, es importante tener en cuenta que, en situaciones donde los ANA se realizan fuera de

contexto clínico, como ocurre en la práctica diaria, y debido a la alta frecuencia de resultados positivos en individuos sanos, el valor de referencia de 1/160 se beneficia de una reducción en la frecuencia de resultados “falsos positivos” sin pérdida significativa de sensibilidad diagnóstica⁽²⁷⁾.

Resultados débilmente positivos de ANA por IFI ocurren en porcentajes variables de adultos saludables, por lo que deben interpretarse con conocimiento de este hecho. Varias fuentes, incluyendo el mencionado documento del Comité Nacional para los estándares de los Laboratorios Clínicos (NCCLS), sugieren que cada laboratorio debe establecer sus propios intervalos de referencia y reportarlo en los informes de laboratorio. Con el uso del sustrato HEp-2, aproximadamente el 20% de las personas normales tienen un título de ANA de 1/40 o superior, y aproximadamente el 5% tiene un título de ANA de 1/160 o mayor. Debido a la baja prevalencia de LES (40-50 casos por 100.000) en la población general, la mayoría de las personas descubiertas al azar con un resultado positivo de ANA no tienen LES. Mientras que el uso de títulos más altos de ANA para definir un resultado positivo puede mejorar la especificidad para el diagnóstico de LES, esta práctica disminuye la sensibilidad diagnóstica de la prueba de ANA (tabla 4)⁽²⁸⁾.

La dilución inicial recomendada de la muestra es 1/40 y un título igual o mayor que 1/160 debe ser considerado positivo.

Títulos bajos (1/40-1/80) de ANA pueden estar presentes en sujetos sanos (especialmente mujeres embarazadas, mujeres mayores de 40 años y personas mayores) y como un fenómeno asociado a infecciones virales, enfermedades hepáticas, síndromes neurológicos paraneoplásicos, síndrome de fatiga crónica y neoplasias de varios tipos.

Títulos bajos de ANA (1/40) raramente están presentes en pacientes con patología autoinmune, pero se observan en aproximadamente el 32% de sujetos saludables; este corte es muy sensible y poco específico.

Títulos altos (>1/160) están presentes en sujetos enfermos, pero solo en 5% de personas sanas; este corte es un poco menos sensible pero más específico. Por cierto, con un título final menor de 1/160, los exámenes de control secundarios producirán resultados positivos en menos del 5% de los casos.

Títulos intermedios pueden estar presentes en aproximadamente el 20% de la población sana y en un pequeño porcentaje de sujetos enfermos.

Por estas razones: títulos de 1/40 y 1/160 son considerados niveles de toma de decisiones que requieren algoritmos operativos diferentes:

1. Títulos menores de 1/40 deben considerarse como negativos.
2. Títulos iguales o mayores que 1/40, pero menos de 1/160, deben considerarse positivos a título bajo (en ausencia de síntomas específicos no se aconsejan exámenes complementarios, pero el paciente debe ser vigilado clínicamente).
3. Títulos iguales o mayores que 1/160 deben considerarse positivos, y los pacientes deben realizarse estudios complementarios porque probablemente presentan una enfermedad autoinmune.

Cada laboratorio debe verificar la consistencia de estos niveles de corte⁽²⁹⁾.

7. Informe del resultado

- Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir solo patrones nucleares.
- Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir patrones nucleares, citoplasmáticos y de aparato mitótico.
- Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir positivo o negativo, sin patrón ni título final.
- Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir positivo o negativo, patrón: nuclear, citoplasmático, aparato mitótico, título final (dilución más alta que se mantiene positiva).
- Frente a un ANA con patrón citoplasmático el informe debería decir ANA negativo, patrón citoplasmático.
- Frente a un ANA con patrón citoplasmático el informe debería decir ANA positivo, patrón citoplasmático.
- El informe de ANA también debería incluir técnica empleada, valores de referencia, sugerir pruebas de seguimiento, relevancia clínica de los resultados.

La estandarización y la armonización son herramientas complementarias para lograr una mayor calidad en las pruebas realizadas en el laboratorio clínico. Ambas son de gran relevancia y necesarias en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes. La armonización de procedimientos y comportamientos es un objetivo factible y debe incluir necesariamente todas las fases del proceso de una prueba de laboratorio: en la fase preanalítica, la adecuación de las solicitudes de prueba, la armonización de terminología de autoanticuerpos y adopción de nomenclatura uniforme para pruebas de la-

laboratorio; en la fase analítica, la armonización de las mediciones y el intercambio de perfiles de prueba y algoritmos de diagnóstico, y en la fase posanalítica, la armonización de la presentación de datos y los criterios para interpretar los resultados inmunoserológicos, especialmente la armonización de unidades, los intervalos de referencia, los límites de decisión y la definición y notificación de valores críticos.

Aquí se proporciona y se discute un ejemplo en lo que respecta a la fase posanalítica, específicamente sobre qué debe incluir el informe de ANA y particularmente nos referiremos a la prueba de ANA por IFI, ya que esta es considerada como método de tamizaje y, por lo tanto, la mayoría de los consensos y recomendaciones giran en torno a dicha prueba.

Se ha discutido mucho en relación con diferentes aspectos del informe, existiendo actualmente diferentes recomendaciones disponibles para informar los resultados de ANA.

En general, hay acuerdo en que el informe debe contener la técnica que se ha utilizado para realizar el estudio. El tipo de ensayo debe especificar el método utilizado, es decir, IFI en células HEp-2 o sustratos alternativos HEp-2, quimioluminiscencia (CLIA), inmunoensayo de cuentas láser direccionables (ALBIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), etc. Algunos autores consideran que es deseable proporcionar también el nombre del fabricante del kit del ensayo, dado que algunos autoanticuerpos y sus respectivos patrones aparecen preferentemente en algunas marcas de láminas HEp-2, como ocurre con anti-SS-A / Ro60 y el patrón antibastones y anillos^(2,30,31). Sin embargo, dicha información no es relevante para la mayoría de los patrones y autoanticuerpos.

El segundo elemento del informe debe contener información sobre la positividad o negatividad de la prueba.

En el caso de las pruebas que miden concentración de anticuerpos mediante técnicas no IFI, debería acompañarse del nivel de anticuerpos (unidades arbitrarias, U/ml, etc.), así como del punto de corte de la técnica y valores de referencia. Cada laboratorio debe verificar el corte recomendado para los kits utilizados para determinar ANA. Se recomienda utilizar sueros emparejados por edad y sexo de sujetos sanos de la población local general; los límites se deben definir como el percentil 95. Estas metodologías no permiten la identificación de patrones⁽¹²⁾.

Cuando se emplea IFI para realizar los ANA, se propone que los resultados sean informados en secuencia, primero positivo/negativo, seguido del título y luego el patrón.

La titulación y el informe del título final (última dilución positiva) expresa, en el caso de la IFI, el nivel de au-

toanticuerpos circulantes; se considera clínicamente relevante, ya que hay una relación directamente proporcional entre el título y la probabilidad de enfermedad autoinmune, dicho de otra forma, títulos elevados de ANA tienen mayor correlación con el diagnóstico⁽⁸⁾. En este sentido hay recomendaciones que avalan realizar e informar título final; sin embargo, en otras recomendaciones se define un título de punto final más allá del cual no se necesitan más diluciones. Las recomendaciones italianas permiten informar la intensidad de fluorescencia en lugar del título. Esta opción puede ser valiosa, ya que existen nuevos sistemas digitales de lectura de ANA que puntúan la intensidad de fluorescencia o proyectan el título de punto final a partir de una única dilución^(32,33).

Cuando se emplea IFI para realizar los ANA, la mayoría de los autores proponen que debe informarse el patrón observado, lo cual debería realizarse según una terminología estandarizada. Las recomendaciones actuales consideran que la nomenclatura para los patrones ANA debe estar de acuerdo con el consenso alcanzado en el primer taller ICAP o por lo menos junto al patrón informado colocar entre paréntesis la clasificación AC de ICAP^(30,34).

Si bien hay acuerdo en que debe informarse el patrón, se discute cuándo se debe informar ANA positivo en función del patrón observado. Cuando se trata de patrones nucleares, no hay duda en que debe informarse ANA positivo, pero cuando la fluorescencia es en citoplasma o aparato mitótico es discutible si debe informarse como ANA positivo o ANA negativo. Algunas recomendaciones sugieren que, ante la presencia de dichos patrones, debe considerarse ANA negativo y hacerse la aclaración de la presencia de citoplasma o aparato mitótico positivo en un ítem aparte.

Este aspecto sigue siendo controvertido, en consensos brasileños sobre ANA se define que los patrones citoplasmáticos se consideren ANA positivos, agregándose un comentario al final del informe en el que se aclara que la prueba de ANA corresponde a una prueba que detecta anticuerpos contra los diferentes antígenos celulares que comprenden a todas las estructuras celulares y no solo al núcleo⁽²⁴⁾. Recomendaciones italianas establecen claramente que un patrón citoplasmático debe considerarse ANA positivo. Otras recomendaciones internacionales no establecen una posición clara respecto a estos patrones, proponiendo que además de los patrones nucleares, también se deben informar y especificar los patrones citoplasmáticos y del aparato mitótico cuando sea posible^(11,12,35).

Cuando se observan patrones mixtos, se sugiere que todos los patrones nucleares se informen primero, después los citoplasmáticos y luego los patrones mitóticos. Cada patrón se debe informar con el título respecti-

vo. Otros autores proponen que una muestra con un patrón exclusivamente citoplasmático se informe como ANA negativo, con una observación del patrón citoplasmático y su título, mientras que una muestra con un patrón mixto nuclear y citoplasmático se informe como ANA positivo^(2,34).

En relación con la inclusión de comentarios sobre interpretación o sugerencias de seguimiento en el informe, las recomendaciones son discordantes. Muchos laboratorios usan comentarios generales con respecto a posibles asociaciones de enfermedades, sin embargo, la mayoría de las recomendaciones no abordan este aspecto. Solo en el consenso brasileño se recomienda la inclusión de tales observaciones en el informe de ANA⁽²⁶⁾. Finalmente, algunas recomendaciones solicitan no proporcionar asociaciones clínicas ya que las mismas están pobremente definidas, en tal sentido cabe destacar que los patrones se relacionan con los antígenos reconocidos y, por ende, los autoanticuerpos afines están asociados con ciertas enfermedades o manifestaciones de enfermedades. Si bien muchos autores consideran que es importante obtener más información sobre la interpretación de los resultados de las pruebas obtenidas, no está claro el contenido de esta información⁽²⁾.

Con respecto a las recomendaciones acerca de pruebas reflejas (aquellas pruebas que se realizan como pruebas confirmatorias cuando la técnica de *screening* es positiva), en algunos lugares se recomienda mencionar los posibles antígenos diana, basándose en el patrón ANA y la información clínica proporcionada⁽³⁶⁻³⁸⁾. Dependiendo de las políticas de costos del laboratorio, institución, etc., las pruebas reflejas se podrían considerar en el marco de algoritmos diagnósticos.

Finalmente, se destaca que la emisión de un informe de resultados de ANA que contenga puntos comunes en todos los laboratorios clínicos es primordial a la hora de armonizar el mismo y en igual sentido establecer un lenguaje común entre los diferentes actores involucrados en este tema.

8. Utilidad de los anticuerpos antinucleares en el diagnóstico

- Los ANA tienen utilidad en el diagnóstico y no deben ser solicitados para evaluar actividad o progresión de una enfermedad autoinmune.
- Puede recomendarse la reiteración de los ANA en los casos donde el perfil clínico varía significativamente, que haga sospechar una superposición con otra enfermedad, o un viraje hacia otra autoinmune diferente a la diagnosticada hasta el momento.
- En los casos donde exista elevada sospecha clínica de la presencia de una enfermedad autoinmune, independientemente del resultado de la detección de los ANA

(por IFI), debe analizarse la presencia de antígenos específicos tales como anti-Jo-1 o anti-SSA/Ro, en función del escenario clínico presente.

- Si la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune es elevada y el estudio inicial de ANA fue hecho mediante una técnica alternativa, es necesario revalorar los ANA mediante IFI (*gold standar*).
- En los casos donde exista elevada sospecha clínica de una enfermedad autoinmune o reumática, el médico puede solicitar la determinación de anticuerpos específicos, independientemente del resultado de los ANA.
- En casos donde la determinación de los ANA fue negativa mediante IFI, frente a la solicitud del médico basado en la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune o reumática, se debe determinar anticuerpos anti-Ribosomal P para pacientes con sospecha de LES (especialmente nefritis lúpica o lupus neuropsiquiátrico por delirium).

La detección de los ANA es el test de laboratorio de primer nivel en el estudio de una enfermedad autoinmune o reumática.

La determinación de los ANA debe ser utilizada para establecer el diagnóstico de una enfermedad autoinmune o reumática y no para monitorear la actividad ni progresión de la enfermedad.

La variación en los títulos de ANA por IFI para monitorear la evolución de una enfermedad autoinmune o reumática no está aconsejada.

Puede recomendarse la reiteración de los ANA en los casos donde el perfil clínico varía significativamente, que haga sospechar una superposición o un viraje hacia otra enfermedad autoinmune diferente a la ya diagnosticada.

En los casos donde exista elevada sospecha clínica de la presencia de una enfermedad autoinmune, independientemente del resultado de la detección de los ANA (por IFI), debe analizarse la presencia de antígenos específicos tales como anti-Jo-1 o anti-SSA/Ro, en función del escenario clínico presente^(12,29).

Si la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune es elevada y el estudio inicial de ANA fue hecho mediante una técnica alternativa, es necesario revalorar los ANA mediante IFI.

En los casos donde exista elevada sospecha clínica de una enfermedad autoinmune, el médico puede solicitar la determinación de anticuerpos específicos, independientemente del resultado de los ANA en casos puntuales, como se detalla a continuación.

En casos donde la determinación de los ANA fue negativa mediante IFI, frente a la solicitud del médico

basado en la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune, se deben determinar los siguientes anticuerpos en función del escenario clínico:

- a) Determinación de anticuerpos anti-Ribosomal P para pacientes con sospecha de LES (especialmente nefritis lúpica o lupus neuropsiquiátrico)⁽³⁸⁾.
- b) Determinación de anti-Jo-1 para pacientes con sospecha de miopatía inflamatoria.
- c) Determinación de anti-SSA/Ro para pacientes con bloqueo cardíaco congénito, lupus neonatal, síndrome de Sjögren, lupus cutáneo subagudo^(12,29,40).

La presencia de diferentes antígenos nucleares y citoplasmáticos en los sustratos de detección puede variar. La matriz mayormente utilizada, sea HEp-2 o HEp-2 enriquecida con Ro-60kD mediante transfección, son variables en la concentración de los antígenos Ro y La. En algunas ocasiones, está presente Ro-60, pero no se encuentra Ro-52, siendo este último el mayormente asociado a bloqueo cardíaco congénito en hijos de madres con LES.

La baja presencia de algunos antígenos en las matrices de detección puede variar, ya sea por ser antígenos muy solubles (como el caso de SSA/Ro) o estar escasamente representados a nivel celular (como en el caso de los antígenos Jo-1 y SSA/Ro).

Los estudios de pacientes seleccionados con diagnóstico de certeza de una enfermedad autoinmune en quienes los estudios de ANA por IFI (con HEp-2 y HEp-2 enriquecida con Ro-60kD) fueron negativos, demostraron, mediante ELISA, la existencia de autoanticuerpos tales como anti-SSA/Ro, anti-SSB/La, anti-RNP y anti-Jo-1⁽⁴¹⁻⁴³⁾.

9. Resultados

De un total de 26 afirmaciones, surgieron 17 recomendaciones que obtuvieron acuerdo en la encuesta realizada al Grupo de votación, considerándose apropiadas. Se descartaron las nueve afirmaciones en las que hubo desacuerdo o indecisión por el Grupo de votación, considerándose inapropiadas (cuadro 1).

Se consideraron las enmiendas o aclaraciones realizadas a alguna de las recomendaciones y se incluyen las mismas en letra cursiva en el listado de recomendaciones (cuadro 2).

Conflicto de intereses

Dra. Raquel Ballesté, no presenta conflicto de intereses.

Dr. Eduardo Coelho Andrade. Presenta conflicto de intereses por honorarios ocasionales por charlas en eventos promovidos por las siguientes industrias: Inova/Werfen, Euroinmun, Aesku, Phadia/Thermo.

Dra. Natalia Rodríguez, no presenta conflicto de intereses.

Dra. Cecilia Montenegro, no presenta conflicto de intereses.

Dr. Ernesto Cairolí, no presenta conflicto de intereses.

Dr. Álvaro Danza, no presenta conflicto de intereses.

Dra. Celia Buzzi, no presenta conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos especialmente a la Dra. Natalia García, al Dr. Andrés Bálsamo y al Dr. José Boggia por su valiosa colaboración en el proyecto.

Bibliografía

1. **Haute Autorité de Santé.** Recommendations par consensus formalicé (RCF). 2010. Disponible en: www.has-sante.fr/portail/jcms/c_272505/recommandations-par-consensus-formalise-rcf [Consulta: 16 febrero 2019].
2. **Damoiseaux J, von Mühlen CA, Garcia-De La Torre I, Carballo OG, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, et al.** International consensus on ANA patterns (ICAP): the bumpy road towards a consensus on reporting ANA results. *Auto Immun Highlights* 2016; 7(1):1.
3. **Carballo O, Ingénito F, Ginaca A, Carabajal P, Costa M, Balbaryski J.** Primer Consenso Argentino para la Estandarización de la Determinación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Inmunofluorescencia Indirecta-HEp-2. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2012; 46(1):3-13.
4. **Dellavance A, Gabriel Júnior A, Cintra AF, Ximenes AC, Nuccitelli B, von Mühlen CA, et al.** I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN HEp-2. *J Bras Patol Med Lab* 2002; 38(3):201-16.
5. **Dellavance A, Gabriel Júnior A, Cintra AF, Ximenes AC, Nuccitelli B, Taliberti BH, et al.** II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2. *Rev Bras Reumatol* 2003; 43(3):129-40.
6. **Pérez D, Gilburd B, Azoulay D, Shovman O, Bizzaro N, Shoefeld Y.** Antinuclear antibodies: is the indirect immunofluorescence still the gold standard or should be replaced by solid phase assays? *Autoimmun Rev* 2018; 17(6):548-52.
7. **Pisetsky DS.** Antinuclear antibody testing - misunderstood or misbegotten? *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13(8):495-502.
8. **Mariz HA, Sato EI, Barbosa SH, Rodrigues SH, Dellavance A, Andrade LE.** 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. *Arthritis Rheum* 2011; 63(1):191-200.
9. **Fritzler MJ.** The antinuclear antibody test: last or lasting gasp? *Arthritis Rheum* 2011; 63(1):19-22.
10. **Tan EM, Feltkamp TE, Smolen JS, Butcher B, Dawkins R, Fritzler MJ, et al.** Range of antinuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40(9):1601-11.
11. **Solomon DH, Kavanaugh AJ, Schur PH; American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Immunologic Testing Guidelines.** Evidence-based guidelines for the use of immunologic tests: antinuclear antibody testing. *Arthritis Rheum* 2002; 47(4):434-44.
12. **Agmon-Levin N, Damoiseaux J, Kallenberg C, Sack U, Witte T, Herold M, et al.** International recommendations for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *Ann Rheum Dis* 2014; 73(1):17-23.
13. **Mills JA.** Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 1994; 330(26):1871-9.
14. **Li QZ, Karp DR, Quan J, Branch VK, Zhou J, Lian Y, et al.** Risk factors for ANA positivity in healthy persons. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(2):R38.
15. **Aringer M, Dörner T, Leuchten N, Johnson SR.** Toward new criteria for systemic lupus erythematosus-a standpoint. *Lupus* 2016; 25(8):805-11.
16. **Danza A, Ruiz-Iratorza G, Khamashta M.** El embarazo en las enfermedades autoinmunes sistémicas: mitos, certezas y dudas. *Med Clin (Barc)* 2016; 147(7):306-12.
17. **Andreoli L, Bertias GK, Agmon-Levin N, Brown S, Cervera R, Costedoat-Chalumeau N, et al.** EULAR recommendations for women's health and the management of family planning, assisted reproduction, pregnancy and menopause in patients with systemic lupus erythematosus and/or antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 2017; 76(3):476-85.
18. **American College of Rheumatology.** Methodology of testing for antinuclear antibodies, 2015:3p. Disponible en: <https://www.rheumatology.org/Portals/0/Files/Methodology of Testing Antinuclear Antibodies Position Statement.pdf> [Consulta: 3 setiembre 2019].
19. **Bonilla E, Francis L, Allam F, Ogrinc M, Neupane H, Phillips PE, et al.** Immunofluorescence microscopy is superior to fluorescent beads for detection of antinuclear antibody reactivity in systemic lupus erythematosus patients. *Clin Immunol* 2007; 124(1):18-21.
20. **Hira-Kazal R, Shea-Simonds P, Peacock JL, Mather J.** How should a district general hospital immunology service screen for anti-nuclear antibodies? An 'in-the-field' audit. *Clin Exp Immunol* 2014; 180:52-7.
21. **Claessens J, Belmondo T, De Langhe E, Westhovens R, Poesen K, Hüe S, et al.** Solid phase assays versus automated indirect immunofluorescence for detection of antinuclear antibodies. *Autoimmun Rev* 2018; 17(6):533-40.
22. **Meroni PL, Bizzaro N, Cavazzana I, Borghi MO, Tincani A.** Automated tests of ANA immunofluorescence as throughput autoantibody detection technology: strengths and limitations. *BMC* 2014; 12:38.
23. **Bizzaro N, Antico A, Platzgummer S, Tonutti E, Bassetti D, Pesente F, et al.** Automated antinuclear immunofluores-

- cence antibody screening: a comparative study of six computer-aided diagnostic systems. *Autoimmun Rev* 2014; 13(3): 292-8.
24. **Menor Almagro R, Rodríguez JF, Martín-Martínez MA, Rodríguez Valls MJ, Aranda Valera C, de la Iglesia Salgado JL.** Asociación entre títulos de anticuerpos antinucleares y conectivopatías sistémicas en una Unidad de Reumatología. *Reumatol Clin* 2017; 13(3):150-5.
 25. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).** Quality assurance for the indirect Immunofluorescence Test for Autoantibodies to Nuclear Antigen (IF-ANA): approved guideline. (NCCLS document I/LA2-A). Wayne, PA: NCCLS, 1996.
 26. **Francescantonio Carvalho PL, de Melo Cruvinel W, Dellavance A, Coelho Andrade LE, Tabiberti BH, von Mühlén CA.** IV Consenso Brasileiro para pesquisa de autoanticorpos em células HEP-2. *Rev Bras Reumatol* 2014; 54(1):44-50.
 27. **Brito de Almeida F, Santos Elói SM, Ferreira GA, Pedrosa W, Gradisse J, Costa LC, et al.** Detecção de anticorpos antinucleares por imunofluorescência indireta em células HEP-2: definindo a diluição de triagem adequada para o diagnóstico das doenças reumáticas autoimunes. *Rev Bras Reumatol* 2013; 54(1):13-20
 28. **Kavanaugh A, Tomar R, Reveille J, Solomon DH, Homburger HA.** Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 2000; 124(1):71-81.
 29. **Tozzoli R, Bizzaro N, Tonutti E, Villalta D, Bassetti D, Manoni F, et al.** Guidelines for the laboratory use of autoantibody tests in the diagnosis and monitoring of autoimmune rheumatic diseases. *Am J Clin Pathol* 2002; 117(29):316-24.
 30. **Chan EK, Damoiseaux J, Carballo OG, Conrad K, de Melo Cruvinel W, Francescantonio PL, et al.** Report of the first international consensus on standardized nomenclature of antinuclear antibody Hep-2 cell patterns 2014-2015. *Front Immunol* 2015; 6:412.
 31. **Schouwers S, Bonnet M, Verschueren P, Westhovens R, Blockmans D, Mariën G, et al.** Value-added reporting of antinuclear antibody testing by automated indirect immunofluorescence analysis. *Clin Chem Lab Med* 2014; 52(4):547-51.
 32. **Mahler M, Meroni PL, Bossuyt X, Fritzler MJ.** Currents concepts and future directions for the assessment of autoantibodies to cellular antigens referred to as anti-nuclear antibodies. *J Immunol Res* 2014:315179.
 33. **Bugdaycý G, Polat M.** Evaluation of antinuclear antibody (ANA) measurement methods. *J Turk Acad Dermatol* 2016; 10(2):16102r1.
 34. **Chan E, Damoiseaux J, de Melo Cruvinel W, Carballo O, Conrad K, Francescantonio P, et al.** Report on the second International Consensus on ANA Pattern (ICAP) workshop in Dresden 2015. *Lupus* 2016; 25(8):797-804.
 35. **Meroni P, Schur P.** ANA screening: an old test with new recommendations. *Ann Rheum Dis* 2010; 69(8):1420-2.
 36. **Sack U, Conrad K, Csernok E, Frank I, Hiepe F, Krieger T, et al.** Autoantibody detection using indirect immunofluorescence on HEP-2 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1173:166-73.
 37. **Robles Marhuenda A, Ramos Casals, M.** Significado clínico de los anticuerpos antinucleares. *JANO* 2005; 1.578:85-90.
 38. **Cabiedes J, Nuñez-Alvarez C.** Anticuerpos Antinucleares. *Reumatol Clin* 2010; 6(4): 224-30.
 39. **Hanly J, Urowitz M, Su L, Bae S, Gordon C, Clarke A, et al.** Autoantibodies as biomarkers for the prediction of neuropsychiatric events in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011; 70(10):1726-32.
 40. **Izmirly P, Saxena A, Kim M, Wang D, Sahl S, Llanos C, et al.** Maternal and fetal factors associated with mortality and morbidity in a multi-racial/ethnic registry of anti-SSA/Ro-associated cardiac neonatal lupus. *Circulation* 2011; 124(18):1927-35.
 41. **Hoffman I, Peene I, Veys E, De Keyser F.** Detection of specific antinuclear reactivities in patients with negative antinuclear antibody immunofluorescence screening tests. *Clin Chem* 2002; 48(12):2171-6.
 42. **Blomberg S, Ronnblom L, Wallgren A, 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* 2000; 51(6):612-7.
 43. **Bossuyt X, Luyckx A.** Antibodies to extractable nuclear antigens in antinuclear antibody-negative samples. *Clin Chem* 2005; 51(12):2426-7.

Cuadro 1. Veintiséis afirmaciones sometidas a votación con sus medianas correspondientes.

1. El nombre más adecuado para denominar la prueba de anticuerpos antinucleares (ANA) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2 es anticuerpos antinucleares. *Valor de la mediana: 3 (No acuerdo con la propuesta)*
2. El nombre más adecuado para denominar la prueba de ANA por IFI sobre células HEp-2 es anticuerpos antinúcleo-citoplasma (ANA). *Valor de la mediana: 7 (Acuerdo con la propuesta)*
3. El nombre más adecuado para denominar la prueba de ANA por IFI sobre células HEp-2 es anticuerpos anticelulares (ANA). *Mediana: 5 (Indecisión)*
4. Los ANA orientan a enfermedad autoinmune sistémica (EAS) y deben solicitarse solo en los casos de cuadro clínico sugestivo de ésta. *Mediana: 8 (Acuerdo)*
5. Los ANA orientan a EAS y su solicitud debe ser el final de un proceso de descarte de otras entidades. *Mediana: 4,5 (Indecisión)*
6. La técnica patrón de oro para el estudio de ANA es la IFI sobre células HEp-2. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
7. No se recomienda utilizar otras técnicas diferentes a la IFI como estudio inicial de ANA, porque las mismas no poseen todos los antígenos que la célula HEp-2 expresa en forma constitutiva, dando resultados falsos negativos. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
8. De optar por la realización de técnicas distintas a la IFI debe aclararse en el informe la técnica utilizada y enumerar en detalle cuáles fueron los anticuerpos estudiados según la combinación de antígenos que incluya el ensayo. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
9. Ante la positividad de ANA por IFI a título significativo debe investigarse la especificidad de los anticuerpos mediante alguna de las técnicas que discriminan separadamente los mismos. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
10. Se han desarrollado sistemas informáticos para la lectura automatizada de las láminas que reconocen la positividad de la fluorescencia y algunos de los patrones más frecuentes. Sin embargo, como no reconocen la totalidad de los patrones descriptos hasta el momento, se recomienda que las imágenes sean revisadas a posteriori por un observador entrenado. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
11. El título inicial adecuado en población adulta (= 16 años) para iniciar la búsqueda de ANA por IFI sobre células HEp-2 es 1/40. *Mediana: 4 (Indecisión)*
12. El título inicial adecuado en población adulta (= 16 años) para iniciar la búsqueda de ANA por IFI sobre células HEp-2 es 1/80. *Mediana: 8 (Acuerdo)*
13. El título inicial adecuado en población adulta (= 16 años) para iniciar la búsqueda de ANA por IFI sobre células HEp-2 es 1/160. *Mediana: 4 (Indecisión)*
14. Los ANA tienen utilidad en el diagnóstico y no deben ser solicitados para evaluar actividad o progresión de una enfermedad autoinmune. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
15. Puede recomendarse la reiteración de los ANA en los casos donde el perfil clínico varía significativamente, que haga sospechar una superposición con otra enfermedad o un viraje hacia otra autoinmune diferente a la diagnosticada hasta el momento. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
16. En los casos donde exista elevada sospecha clínica de la presencia de una enfermedad autoinmune, independientemente del resultado de la detección de los ANA (por IFI), debe analizarse la presencia de antígenos específicos tales como anti-Jo-1 o anti-SSA/Ro, en función del escenario clínico presente. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
17. Si la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune es elevada y el estudio inicial de ANA fue hecho mediante una técnica alternativa, es necesario revalorar los ANA mediante IFI (*gold standar*). *Mediana: 9 (Acuerdo)*
18. En los casos donde exista elevada sospecha clínica de una enfermedad autoinmune o reumática, el médico puede solicitar la determinación de anticuerpos específicos, independientemente del resultado de los ANA. *Mediana: 8 (Acuerdo)*
19. En casos donde la determinación de los ANA fue negativa mediante IFI, frente a la solicitud del médico basado en la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune o reumática, se debe determinar anticuerpos anti-Ribosomal P para pacientes con sospecha de LES (especialmente nefritis lúpica o lupus neuropsiquiátrico por delirium). *Mediana: 8 (Acuerdo)*
20. Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir solo patrones nucleares. *Mediana: 1 (No acuerdo)*
21. Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir patrones nucleares, citoplasmáticos y de aparato mitótico. *Mediana: 9 (Acuerdo)*
22. Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir positivo o negativo, sin patrón ni título final. *Mediana: 1 (No acuerdo)*
23. Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir-positivo o negativo, patrón: nuclear, citoplasmático, Aparato mitótico, título final (dilución más alta que se mantiene positiva). *Mediana: 9 (Acuerdo)*
24. Frente a un ANA con patrón citoplasmático el informe debería decir ANA negativo, patrón citoplasmático. *Mediana: 5 (Indecisión)*
25. Frente a un ANA con patrón citoplasmático el informe debería decir ANA positivo, patrón citoplasmático. *Mediana: 7 (Acuerdo)*
26. El informe de ANA también debería incluir técnica empleada, valores de referencia, sugerir pruebas de seguimiento, -relevancia clínica de los resultados. *Mediana: 7 (Acuerdo)*

Cuadro 2. Recomendaciones**1º Consenso Uruguayo de Anticuerpos Antinucleares**

1. El nombre más adecuado para denominar la prueba de ANA por IFI sobre células HEp-2 es anticuerpos antinúcleo-citoplasma (ANA). *Enmienda del grupo de referentes internacionales: desde un punto de vista lingüístico, en los países de habla hispana las siglas de Ac. antinúcleo citoplasma (ANA) deberían ser AAN.*
2. Los ANA orientan a enfermedad autoinmune sistémica (EAS) y deben solicitarse en los casos con un cuadro clínico sugestivo de ésta. *Enmienda del grupo directivo: son de utilidad diagnóstica además en ciertas enfermedades autoinmunes órgano específicas.*
3. La técnica patrón de oro para el estudio de ANA es la IFI sobre células HEp-2.
4. No se recomienda utilizar otras técnicas, diferentes a la IFI, porque no poseen todos los antígenos que la célula HEp-2 expresa en forma constitutiva, dando resultados falsos negativos.
5. Si bien no se recomienda realizar técnicas distintas a la IFI para el estudio inicial de ANA, en caso de realizarse, se debe aclarar en el informe la técnica utilizada y enumerar en detalle cuáles fueron los anticuerpos estudiados según la combinación de antígenos que incluya el ensayo.
6. Ante la positividad de ANA por IFI a título significativo debe investigarse la especificidad de los anticuerpos mediante alguna de las técnicas que discriminan separadamente los mismos.
7. Se han desarrollado sistemas informáticos para la lectura automatizada de las láminas que reconocen la positividad de la fluorescencia y algunos de los patrones más frecuentes. Sin embargo, como no reconocen la totalidad de los patrones descritos hasta el momento, se recomienda que las imágenes sean revisadas a posteriori por un observador entrenado.
8. El título inicial adecuado en población adulta (= 16 años) para iniciar la búsqueda de ANA por IFI sobre células HEp-2 es 1/80.
9. Los ANA por IFI tienen utilidad en el diagnóstico y no deben ser solicitados para evaluar actividad o progresión de una enfermedad autoinmune o reumática.
10. Puede recomendarse la reiteración de los ANA en los casos donde el perfil clínico varía significativamente, que haga sospechar una superposición o un viraje hacia otra enfermedad autoinmune diferente a la ya diagnosticada.
11. En los casos donde exista elevada sospecha clínica de la presencia de una enfermedad autoinmune, independientemente del resultado de la detección de los ANA (por IFI), debe analizarse la presencia de antígenos específicos tales como anti-Jo-1 o anti-SSA/Ro, en función del escenario clínico presente. *Enmienda del grupo revisor: para ello es fundamental la buena comunicación médico clínica y laboratorio mediante la vía más adecuada a cada caso.*
12. En casos donde la determinación de los ANA fue negativa mediante IFI, frente a la solicitud del médico basado en la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune, se debe determinar anticuerpos anti-Ribosomal P para pacientes con sospecha de LES (especialmente nefritis lúpica o lupus neuropsiquiátrico).
13. Si la sospecha clínica de la existencia de una enfermedad autoinmune es elevada y el estudio inicial de ANA fue hecho mediante una técnica alternativa, es necesario revalorar los ANA mediante IFI sobre células HEp-2.
14. Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI, el informe de resultados de la prueba debería incluir patrones nucleares, citoplasmáticos y de aparato mitótico.
15. Cuando el laboratorio realiza la detección de ANA por técnica de IFI sobre células HEp-2, el informe de resultados de la prueba debería incluir:
 - Positivo o negativo
 - Patrón: nuclear, citoplasmático, aparato mitótico
 - Título final (dilución más alta que se mantiene positiva).
16. Frente a un ANA con patrón citoplasmático el informe debería decir:
 - Ac. Antinúcleo citoplasmático (ANA): positivo, patrón: citoplasmático.
17. El informe de ANA también debería incluir:
 - Siempre: técnica empleada y valores de referencia
 - Opcional: pruebas de seguimiento sugeridas y relevancia clínica de los resultados. *Enmienda del grupo de referentes nacionales: es preferible la comunicación del laboratorio con el médico tratante para realizar estas sugerencias en forma directa y no a través del informe.*