

O LABORATÓRIO NAS DOENÇAS SISTÊMICAS AUTO-IMUNES DA CÉLULA LE À CÉLULA HEP-2: UMA JORNADA DE 50 ANOS REVELANDO AUTO-ANTICORPOS

THE LABORATORY IN THE SYSTEMIC AUTOIMMUNE DISEASES FROM THE LE CELL TO HEP-2 LINEAGE:
A JOURNEY THROUGH 50 YEARS OF AUTOANTIBODIES DISCOVERY

RAQUEL MONTEIRO DE CASTRO LARA*, SUZANE PRETTI FIGUEIREDO NEVES**

RESUMO

O termo “anticorpos antinucleares” é usado para designar um grupo de auto-anticorpos contra diversos componentes celulares, cuja produção é considerada característica das doenças sistêmicas auto-imunes. Sua detecção tem sido a principal ferramenta de auxílio no diagnóstico de tais afecções. Este artigo apresenta uma revisão histórica sobre a pesquisa de anticorpos antinucleares: a descoberta da célula LE, o método tradicional de FAN por imunofluorescência indireta e o rastreamento de auto-anticorpos por imunoenensaio enzimático.

Palavras-chave: Técnicas e procedimentos de laboratório / história; Anticorpos antinucleares; História da Medicina

INTRODUÇÃO

O diagnóstico das doenças reumatológicas auto-imunes é considerado complexo devido ao seu pleomorfismo clínico. Assim, desde que estas afecções foram reconhecidas, há necessidade de exames complementares, capazes de ajudar na diferenciação de fenômenos auto-imunes irrelevantes de doenças auto-imunes e, em alguns casos, diferenciar uma doença de outra^{1,2}.

Os anticorpos antinucleares (ANA) são um grupo diversificado de auto-anticorpos que reagem com componentes celulares, cuja produção aumentada é considerada característica das doenças auto-imunes sistêmicas, incluindo Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Síndrome de Sjögren (SS), Artrite Reumatóide (AR), Esclerose

Sistêmica Progressiva, Polimiosite e Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC)³.

Este artigo revisa a propedêutica laboratorial disponível para detecção dos ANAs, com enfoque na metodologia, indicando as vantagens e limitações de cada técnica e fornecendo informações úteis para uma abordagem mais racional do paciente com suspeita de doenças auto-imunes sistêmicas.

A CÉLULA LE

A observação da célula LE (Lupus Erythematosus Cell) por Hargraves, Richmond e Morton⁴, em 1948, deu-se em um exame microscópico de esfregaço de medula óssea de um paciente com lúpus eritematoso sistêmico, que foi acidentalmente incubada. Estes autores observaram um neutrófilo contendo uma inclusão citoplasmática grande, arredondada, homogênea e levemente acidófila, que deslocava o núcleo do polimorfonuclear para a periferia (Figura 1).

* Médica Residente de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial do HC-UFMG

** Professora Adjunta do Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG. Coordenadora do Setor de Soro-imunologia do Serviço de Medicina Laboratorial do HC-UFMG

Departamento de Propedêutica Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG

Endereço para correspondência:

Suzane Pretti Figueiredo Neves

Avenida Alfredo Balena, 190 – 6º andar.

Bairro Santa Efigênia, Belo Horizonte – MG.

E-mail: suzane@medicina.ufmg.br

Data de Submissão:

20/02/04

Data de Aprovação:

02/08/04

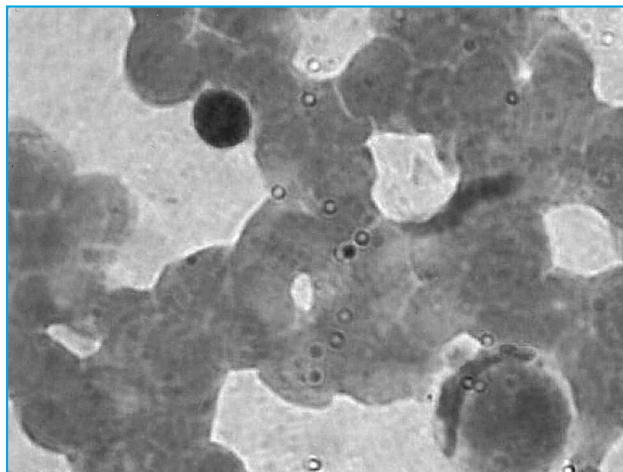


Figura 1 - Célula LE 1000X

Fonte: Serviço de Medicina Laboratorial do HC – UFMG

A partir desta descoberta, a célula LE foi considerada um marcador do LES e a “Pesquisa de Células LE no sangue periférico” foi o primeiro método de detecção de anticorpos antinucleares. O teste, trabalhoso e artesanal, procurava imitar *in vitro* as circunstâncias em que a célula LE foi vista pela primeira vez. Consistia na adição de pérolas de vidro a um tubo de sangue anticoagulado que era agitado repetidamente, de modo a danificar algumas células, liberando o núcleo e outros fragmentos nucleares. Acreditava-se que, durante a incubação, auto-anticorpos – anti-DNP (desoxiribonucleoproteína) – contidos no soro, opsonizariam núcleos celulares que, posteriormente, seriam fagocitados por leucócitos polimorfonucleares, formando as células LE vistas nos esfregaços corados com Giemsa². Entretanto, apenas 30% dos pacientes lúpicos apresentavam pesquisa de células LE positiva. Ainda assim, por ser o único exame laboratorial disponível e apresentar boa especificidade, a presença destas células no sangue periférico foi incluída entre os critérios do *American College of Rheumatology* para diagnóstico de LES, em 1982⁵.

Baseado no suposto mecanismo de formação desta célula, por muitos anos prevaleceu o dogma de que auto-anticorpos eram reativos apenas no meio extracelular e que as lesões teciduais observadas seriam resultantes da formação de imunocomplexos e posterior ativação do complemento. Mais recentemente, demonstrou-se que os anticorpos antinucleares são capazes de penetrar, reagir e alterar funções de células vivas⁶. O mecanismo básico do fenômeno da célula LE é, na verdade, a fagocitose de restos celulares originados de apoptose induzida pela internalização de anticorpos antinucleares, mais especificamente do anti-dsDNA, abrindo novas possibilidades para o entendimento dos processos imunopatológicos e novas perspectivas de atuação fisiológica da resposta humoral⁷.

Apesar do grande valor histórico da célula LE e do papel fundamental representado por ela na elucidação da

patogenia das doenças auto-imunes, sua procura em sangue periférico é considerada hoje ultrapassada, tendo deixado de figurar entre os critérios diagnósticos de LES, desde 1997⁸. Entretanto, quando encontradas *in vivo* em derrames cavitários, são pistas diagnósticas valiosas e de grande especificidade.

O FAN

Em 1957, com o desenvolvimento de técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), surgia o exame conhecido como FAN (fator antinuclear) para identificação de anticorpos antinucleares⁹. Mais sensível e de execução mais fácil que a pesquisa de células LE, em 1982 o FAN passou a fazer parte dos critérios revisados do *American College of Rheumatology*, como um dos onze critérios diagnósticos de LES⁵.

A técnica consiste na incubação de diluições seriadas do soro do paciente em lâmina contendo células animais como substrato. Estando presentes, os anticorpos reagem com os antígenos celulares, formando um complexo antígeno-anticorpo. Anti-imunoglobulina humana conjugada com fluoresceína é adicionada e, posteriormente, a lâmina é examinada em um microscópio de luz UV. Assim, dependendo do(s) anticorpo(s) existente(s), vários padrões fluorescentes podem ser observados².

O teste utilizava, inicialmente, substratos de células animais: *in prints* ou cortes histológicos de rim ou fígado de roedores. Atualmente, recomenda-se o uso de células tumorais da linhagem HEp-2, originadas de tumores epiteliais de laringe^{10,11,13}. Entre as vantagens que estas células oferecem está o fato de que se trata de antígenos humanos e não de animais. Apresenta, ainda, maior sensibilidade devido às suas características neoplásicas, tais como a grande relação núcleo/citoplasma, presença de vários nucléolos e citoplasma rico em fibrilas e organelas. Além disso, as células HEp-2 podem ser visualizadas em todas as fases da divisão celular, aumentando ainda mais o número de antígenos expostos.

Hoje, a pesquisa de auto-anticorpos em células HEp-2 é capaz de detectar anticorpos circulantes dirigidos contra os mais variados constituintes celulares: antígenos nucleares, nucleolares, citoplasmáticos e do aparelho mitótico¹⁰⁻¹³. Devido à variedade de antígenos detectáveis por este teste, recomenda-se aos laboratórios alterar sua denominação, deixando claras as reais potencialidades do método¹². (Figura 2). Recomenda-se, também, que o laudo do exame contemple todas as possíveis reatividades observadas nos diversos compartimentos celulares, bem como uma breve interpretação dos achados.

O Uso Clínico do FAN

A principal indicação clínica para a pesquisa do FAN continua sendo no diagnóstico de LES. Praticamente, todos os pacientes com LES têm um FAN positivo quan-

do são utilizadas células HEp-2, o que se traduz em sensibilidade de 93% a 100%. Portanto, um FAN negativo virtualmente afasta a possibilidade da doença. Entretanto, a especificidade do teste é baixa, estimada em 57%, pois o teste pode ser positivo em uma infinidade de situações como infecções viróticas (inclusive por HIV), hanseníase, endocardite bacteriana, hepatites, alergias e neoplasias, principalmente linfoma. Pode ser positivo, também, em pacientes com implantes de silicone e até mesmo em indivíduos saudáveis^{2,14,16}. A explicação para a presença de auto-anticorpos em tantas condições é que a maioria deles não é específica para doenças auto-imunes e podem ser produzidos como resultado da ativação policlonal de linfócitos B em situações de grande estimulação antigênica^{16,17}.

Figura 2 - Novas denominações recomendadas para o teste do FAN

1. FAN – Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo, nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico
2. FAN – Pesquisa de auto-anticorpos
3. Pesquisa de auto-anticorpos (FAN e citoplasmáticos)
4. Pesquisa de anticorpos contra componentes do núcleo (FAN), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico
5. Pesquisa de auto-anticorpos contra antígenos intracelulares (FAN)

Extraída do II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-2¹²

Reações falso-negativas podem ocorrer em alguns pacientes com anticorpos anti-SS-A/Ro isolado. Este antígeno está presente em pequenas quantidades na célula HEp-2 intacta e, durante a fixação na lâmina, pode ser perdido, o que pode levar a resultados falso-negativos em até 26% das amostras positivas para este anticorpo, quando pesquisado por técnicas específicas¹⁵. A Tabela 1 mostra valores de sensibilidade e especificidade do FAN nas principais doenças reumatológicas auto-imunes.

Tabela 1 - Sensibilidade e Especificidade do FAN nas diversas doenças reumatológicas.

Doença Reumatológica	Sensibilidade	Especificidade
Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	93 a 100%	57%
Esclerose Sistêmica	60 a 85%	54%
Síndrome de Sjögren	40 a 70%	52%
Polimiosite	50 a 70%	63%
Artrite Reumatóide	30 a 50%	56%
Doença Mista do Tecido Conjuntivo	100%	-----
Lúpus induzido por drogas	100%	-----

Adaptada de Wanchu, 2000² e Solomon, 2002¹⁴

No que diz respeito à utilidade clínica de um teste, é extremamente importante o conhecimento dos valores preditivos positivo (VPP) e negativo (VPN). O valor preditivo negativo do FAN para LES é extremamente elevado, ou seja, diante de um FAN negativo, a possibilidade de não haver a doença é de virtualmente 100%. O valor preditivo positivo por sua vez, é bastante baixo, em torno

de 11%. Dessa forma, ao analisar um FAN positivo, o clínico deve ter em mente o baixo poder deste teste em indicar a presença desta doença.

Um problema muito expressivo no dia-a-dia do laboratório é a positividade do teste sem que haja correlação clínica. Em soro puro ou em baixas diluições, virtualmente toda a população apresenta reatividade na pesquisa de FAN; daí a necessidade de um valor de corte adequado. Mudanças na distribuição dos títulos dos auto-anticorpos na população são idade e sexo dependente. Craig et al. mostraram que 95% da população masculina e 95% das mulheres com menos de 20 anos apresentam reatividade em títulos menores ou iguais a 1:32. Entre mulheres acima de 40 anos, este título desloca-se para 1:128. Assim, o valor de 1:40, freqüentemente usado como valor de corte para positividade, não distingue bem doença de saúde¹⁸. Para minimizar essa situação, vários laboratórios adotam um valor de corte de 1:80^{10,11}. Ainda assim, até 13,3% da população sadia pode ter um teste positivo^{12,19}. Tan et al., após estudo multicêntrico sobre a prevalência e títulos de FAN positivo na população “sadia”, recomendam a liberação do resultado na diluição de 1:40 e 1:160, acompanhado da informação sobre o percentual de falsos-positivos encontrados em cada nível de corte. Geralmente, quanto mais alto o título, mais significativo o resultado do exame, especialmente em pacientes jovens¹⁷. A Figura 3 ilustra a dispersão de títulos do FAN em algumas condições em que este exame pode estar positivo.

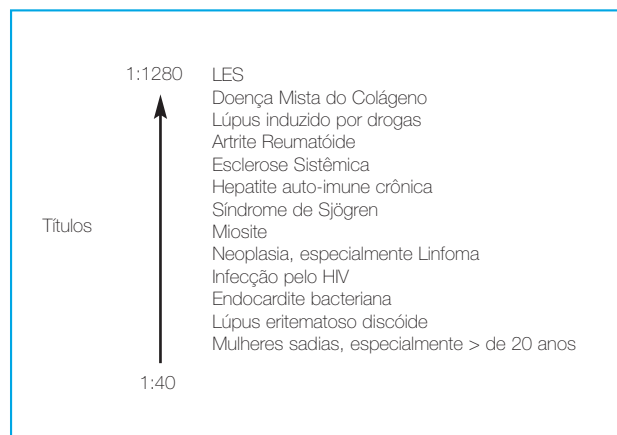


Figura 3 - Títulos de FAN-HEp-2 nas diversas condições clínicas

Extraída de Barland e Lipstein, 1996²⁰

Em contrapartida, em situações de forte suspeita clínica, sem que haja definição quanto ao diagnóstico, pode ser útil repetir o teste no futuro, uma vez que as doenças reumatológicas são de natureza espectral². Dijkstra et al. demonstraram, em estudo prospectivo, que 58% dos pacientes com FAN positivo, que não receberam imediatamente diagnóstico de doença reumática, desenvolveram

colagenoses em um período de cinco anos de seguimento. Destes, 75% receberam o diagnóstico nos dois anos seguintes, justificando a recomendação de acompanhamento mínimo por este período, desde que haja suspeita clínica de doença²¹.

Outro problema de grande importância é a variação intra e inter-laboratorial do teste, devido à sua interpretação “examinador dependente” e à falta de padronização metodológica²⁰. Em agosto de 2000, o I Consenso Brasileiro de FAN-HEp2, realizado em Goiânia, uniformizou a diversificada nomenclatura para descrição de um mesmo aspecto morfológico, eliminando uma grande fonte de confusão na interpretação dos resultados. Foi também proposto o valor de corte de 1:80 ou 1:160, conforme o microscópio utilizado^{10,11}. Com o II Consenso Brasileiro de FAN-HEp2, em 2002, foram organizadas as associações existentes entre os padrões de fluorescência e doenças reumatológicas auto-imunes, visando oferecer ao clínico correlações atualizadas entre a presença do(s) anticorpo(s) e doença¹².

PADRÕES DE FLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS HEP-2

Os padrões observados à microscopia sugerem o tipo de anticorpo predominante no soro e a natureza do antígeno

com o qual este anticorpo reage (Tabela 2). Alguns padrões de fluorescência são relativamente inespecíficos, podendo corresponder a anticorpos distintos. Alguns achados, entretanto, são correlacionados com situações clínicas específicas. No LES, a detecção dos anticorpos anti-dsDNA e anti-Sm é utilizada como um dos critérios diagnósticos. Sua presença no soro é sugerida pelos padrões de fluorescência nuclear homogêneo e pontilhado grosso, respectivamente. O anticorpo anti-topoisomerase-I corrobora o diagnóstico de esclerose sistêmica progressiva e sua pesquisa é recomendável quando ocorre padrão de imunofluorescência misto, do tipo nuclear e nucleolar pontilhado (Tabela 2). O padrão centromérico, por sua vez, corresponde ao anticorpo anti-centrômero e sugere o diagnóstico de esclerose sistêmica do tipo CREST, de melhor prognóstico. Este padrão é tão específico que dispensa a pesquisa do anticorpo por outras técnicas. Um padrão pontilhado fino é comumente relacionado à presença de anticorpos anti-SSA-Ro e SSB-La, que podem estar presentes no LES e na Síndrome de Sjögren. O encontro de anticorpos anti-histonas, correspondente ao padrão nuclear homogêneo, na ausência de outros anticorpos, é encontrado no lúpus induzido por drogas³.

Tabela 2 - Padrões de fluorescência do FAN e associação com doenças reumatológicas

Padrão nuclear	Anticorpo específico	Doença associada
Nuclear Homogêneo	Anti-ds-DNA* Anti-histonas Anti-cromatina	LES LE induzido por drogas LES e LE induzido por drogas
Nuclear Pontilhado Pleomórfico (PCNA)	Anti-núcleo de células em proliferação	LES
Nuclear Pontilhado Grosso	Anti-Sm Anti-RNP	LES DMTC, Esclerose Sistêmica, LES, AR
Nuclear Pontilhado Fino	Anti-SS-A/Ro Anti-SS-B/La	Síndrome Sjögren, LES Síndrome Sjögren, LES
Nuclear Pontilhado Centromérico	Anti-centrômero	CREST, Cirrose Biliar Primária
Membrana Nuclear Contínua	Anti-lâmina	Hepatites Auto-imunes
Nucleolar Aglomerado	Anti-fibrilarina (U3-nRNP)	Esclerose Sistêmica
Nucleolar Pontilhado	Anti-NOR-90 Anti-RNA polimerase I	Esclerose Sistêmica Esclerose Sistêmica
Nucleolar Homogêneo	Anti-PM/ScI	Superposição de Polimiosite e Esclerose Sistêmica
Misto do tipo Nucleolar Homogêneo e Nuclear Pontilhado Grosso com placa metafásica decorada em anel (cromossomos negativos)	Anti-ku	Superposição de Polimiosite e Esclerose Sistêmica
Misto do tipo Nuclear e Nucleolar pontilhado com placa metafásica Positiva	Anti-topoisomerase I (ScI-70)	Esclerose Sistêmica forma difusa

Adaptada do II Consenso Brasileiro de Fator Antinuclear em Células HEp-212

* Anti-ds-DNA: double-stranded DNA ou DNA dupla fita ou DNA nativo.

** O clássico padrão periférico observado em corte histológico e in prints, relacionado ao anticorpo anti-ds-DNA, não é mais visualizado em células HEp-2. Uma discreta fluorescência da membrana nuclear é observada na presença do anticorpo anti-membrana nuclear (anti-lâmina nuclear), sendo por vezes descrito como padrão homogêneo-periférico, porém sem relação como o anticorpo anti-ds-DNA.

Assim, o FAN-HEp-2 é um importante método de triagem, pois, possibilitando o conhecimento do(s) anti-corpo(s) provavelmente envolvido(s), orienta o próximo passo na investigação e os pedidos de exames laboratoriais subsequentes, contribuindo para a viabilidade econômica do processo diagnóstico^{10,11,22}.

A dosagem dos anticorpos específicos, quando indicada, pode ser feita por diversas metodologias, entre elas a imunodifusão dupla Outcherlony, hemaglutinação, enzima-imunoensaio (EIA) ou imunoblot². A Figura 4 apresenta um fluxograma para orientação do clínico na conduta laboratorial diante de um paciente com suspeita clínica de doença reumatológica sistêmica auto-imune¹⁶.

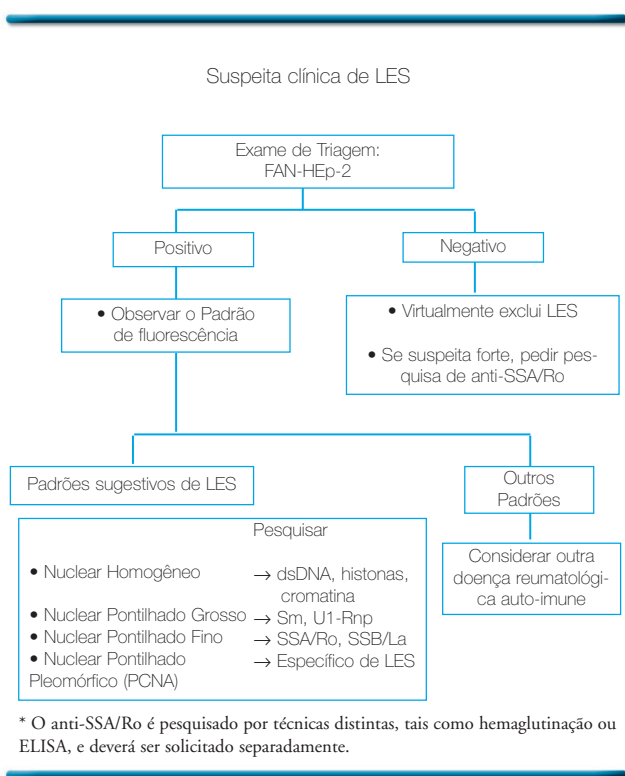


Figura 4 - Fluxograma para conduta na suspeita de LES

A PESQUISA DE ANTICORPOS ANTINUCLEARES POR IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO

Uma metodologia que vem ganhando cada vez mais espaço no mercado internacional é a pesquisa do FAN por imunoensaio enzimático (EIA)²³. O teste consiste na utilização de um conjunto de antígenos celulares adsorvidos na superfície interna de uma placa de poliestireno que servirá como substrato para a captura dos anticorpos porventura presentes na amostra do paciente. Estes se ligam ao(s) antígeno(s) na placa e o imunocomplexo

resultante é revelado pela adição de anti-imunoglobulina humana marcada com enzima que, ao consumir um substrato específico, gera cor de intensidade proporcional à quantidade de anticorpos. O produto corado é lido por espectrofotometria e os resultados são expressos em unidades numéricas, calculadas pela comparação com uma curva padrão. Esta técnica é útil, pois é passível de automação e fornece resultados semi-quantitativos independentes da habilidade do observador, dispensando a necessidade de mão-de-obra especializada²⁴⁻²⁷. Entretanto, não fornece indicação quanto à especificidade do anticorpo envolvido no processo, o que constitui sua principal limitação^{28,29}. Há, ainda, a necessidade de valores de corte adequados, os quais ainda não estão bem estabelecidos.

A utilização destes imunoensaios, mais sensíveis que a imunofluorescência, tem trazido problemas na interpretação de resultados antes considerados específicos para certas condições clínicas. Medeiros demonstrou positividade para anti-Sm, considerado marcador de LES, em 2,2% dos pacientes com outras doenças reumáticas e 2,3% do grupo controle. Foi detectado anti-Scl70 em 3,6% e anti-Jo-1 em 2,5% dos pacientes reumatológicos sem diagnóstico respectivamente, de esclerose sistêmica e polimiosite³⁰.

Já existem vários kits comerciais no mercado e diversos trabalhos científicos avaliando os seus desempenhos em comparação à técnica de imunofluorescência em células HEp-2^{28,31,32}. Tais estudos comparativos mostram que a sensibilidade e especificidade variam significativamente entre os imunoensaios enzimáticos, geralmente na dependência do substrato utilizado³³. O emprego de extrato de núcleo das células HEp-2 tem a vantagem de capturar todos os anticorpos anti-celulares potenciais. Por outro lado, quando é utilizada uma mistura de antígenos sintetizados por técnicas recombinantes, a sensibilidade do kit deve ser confirmada pelo laboratório, pois a ausência de algum antígeno importante na preparação antigênica pode levar a maior taxa de resultados falsos negativos²⁹.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa de auto-anticorpos que reagem com constituintes celulares constitui uma ferramenta essencial para o diagnóstico das doenças auto-imunes. Seu valor depende da especificidade e sensibilidade intrínsecas do teste, mas, principalmente, de seu valores preditivos, diretamente relacionados à prevalência da doença na população testada. Suarez-Almazor et al. constataram valores preditivos positivos diferentes entre clínicos gerais e reumatologistas. Entre estes últimos, cujos

pacientes apresentavam maior prevalência de doença reumática, o valor preditivo positivo do FAN foi significativamente maior. Isso se deve, em grande parte, à utilização indiscriminada do exame pelos clínicos³⁴. Pacientes com, por exemplo, doença extra-articular isolada ou sintomas constitucionais não específicos, como fadiga, apresentam poucas chances de ter doença reumática associada com FAN positivo. Uma seleção mais criteriosa dos pacientes seria capaz de melhorar o valor preditivo positivo do teste. Por outro lado, o FAN tem um excelente valor preditivo negativo – praticamente 100% – de modo que, em face de um teste negativo, pode ser necessário reconsiderar a suspeita diagnóstica^{34,35}.

Dessa forma, o exame bem indicado, sustentado por uma suspeita clínica consistente e que, por sua vez, é bem interpretado pelo médico assistente, contribuirá não só para o acerto do diagnóstico, como também para a orientação da propedêutica subsequente, diminuindo o volume de exames, reduzindo custo e trabalho, encaminhamentos desnecessários e terapia inapropriada.

ABSTRACT

“Anti-nuclear autoantibodies” (ANA) refer to a group of autoantibodies against several cellular components. They are overexpressed in systemic autoimmune diseases and its detection/ presence has been the main diagnostic finding of such affections. This review covers: the discovery of LE cell, the indirect immunofluorescent detection of ANA, and the recent introduced method of ANA testing by enzyme immunoassay (EIA) screen.

Keywords: Laboratory techniques and procedures / history; Antinuclear antibodies; History of Medicine

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Kavanaugh AF, 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; 124:71-81.
- 2- Wanchu A. Antinuclear Antibodies: Clinical Applications. *J Postgrad Med* 2000; 46:144-8.
- 3- Tan EM. Autoantibodies in diagnosis and in identifying autoantigens. *The Immunologist* 1999; 7:85-92.
- 4- Hargraves M, Richmod H, Morton R. Presentation of two bone marrow components, the tart cell and the LE cell. *Mayo Clin Proc* 1948; 27:25-8.
- 5- Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (SLE). *Arthritis Rheum* 1982; 25:1271-7.
- 6- Ruiz-Argüelles A. Novel facts about an old marker: the LE cell. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61(Suppl 235):31-7.
- 7- Schmidt-Acevedo S, Pérez-Romano B, Ruiz-Argüelles A. ‘LE cells’ result from phagocytosis of apoptotic bodies induced by antinuclear antibodies. *J Autoimmun* 2000; 15: 15-20.
- 8- Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1725.
- 9- Friou GJ. Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescein antibody technique. *J Clin Invest* 1957; 36:890-5.
- 10- Pfrimer IAH, Franscscantônio PL, von Mühlen CA. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN Hep-2. *Rev Bras Reumatol* 2001; 41:267-73.
- 11- Pfrimer IAH, Franscscantônio PL, von Mühlen CA. I Consenso Nacional para Padronização dos Laudos de FAN Hep-2. *J Bras Patol Med Labor* 2002; 38:207-16.
- 12- Dellavance Júnior AG, Cintra AFU. II Consenso Brasileiro de fator antinuclear em células Hep-2: definições para a padronização da pesquisa de auto-anticorpos contra constituintes do núcleo (FAN Hep-2), nucléolo, citoplasma e aparelho mitótico. *Rev Bras Reumatol* 2003; 43:129-40.
- 13- Andrade LEC. Como valorizar os resultados de teste de FAN (anticorpos antinúcleo) e suas diferentes metodologias. *Sinop Reumatol* 2002; 4:3-9.
- 14- 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; 47:434-44.
- 15- 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* 2000; 51:612-7.
- 16- Hansen KE, Arnason J, Bridges AJ. Autoantibodies and common viral illnesses. *Sem Arthritis Rheum* 1998; 27:263-71.
- 17- Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 2000; 55:424-32.
- 18- Craig WY, Ledue TB, Johnson AM, Ritchie RF. The distribution of antinuclear antibody titers in “normal” children and adults. *J Rheumatol* 1999; 26:914-9.
- 19- Tan EM. Range of antinuclear antibodies in “healthy” individuals. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1601-11.
- 20- Barland P, Lipstein E. Selection and use of laboratory tests in the rheumatic diseases. *Am J Med* 1996; 100:16S-23S.
- 21- Dijkstra S, Nieuwenhuys EJ, Swaak AJG. The prognosis and outcome of patients referred to an outpatient clinic for rheumatic diseases characterized by the presence of anti-

- nuclear antibodies (ANA). *Scand J Rheumatol* 1999; 28:33-7.
- 22- Solomon DH, Shmerling RH, Schur PH, Lew R, Fiskio J, Bates DW. A computer based intervention to reduce unnecessary serologic testing. *J Rheumatol* 1999; 26:2578-84.
- 23- Kumagai S, Hayashi N. Immunofluorescence – still the ‘gold standard’ in ANA testing? *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61:77-83.
- 24- Bayer PM, Fabian B, Hubl W. Immunofluorescence assays (IFA) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) in autoimmune disease diagnostics – technique, benefits, limitations and applications. *Scand J Clin Lab Invest* 2001; 61:68-76.
- 25- Lehmann HP, Fuhling I, Ott C, Hudepohl B, Haass M. Hep-2 ANA EIA: a new fully automated assay for the screening of antinuclear antibodies. *Isr Med Assoc J* 2000; 2:646-8.
- 26- Rondeel JM, van Gelder W, van der Leeden H, Dinkelaar RB. Different strategies in the laboratory diagnosis of autoimmune disease: immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay or both? *Ann Clin Biochem* 1999; 36:189-95.
- 27- Rondeel JM. Immunofluorescence versus ELISA for the detection of antinuclear antigens. *Expert Rev Mol Diagn* 2002; 2:226-32.
- 28- Homburger HA, Cahen YD, Griffiths J, Jacob GL. Detection of Antinuclear Antibodies: comparative evaluation of enzyme immunoassay and indirect immunofluorescence methods. *Arch Pathol Lab Med* 1998; 122:993-9.
- 29- Emlen W, O’Neill L. Clinical Significance of antinuclear antibodies – comparison of detection with immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays. *Arthritis Rheum* 1997; 40:1612-8.
- 30- Medeiros KX. Comparação de diferentes métodos laboratoriais para a identificação de anticorpos antinucleares e avaliação do desempenho diagnóstico dos mesmos nas doenças reumáticas auto-ímmunes [dissertação]. São Paulo, SP: Universidade Federal de São Paulo; 1997.
- 31- Tan EM. A critical evaluation of enzyme immunoassay kits for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. I. Precision, sensitivity, and specificity. *Arthritis Rheum* 1999; 42:455-64.
- 32- Tan EM. A critical evaluation of enzyme immunoassay kits for detection of antinuclear autoantibodies of defined specificities. II potential for quantitation of antibody content. *J Rheumatol* 2002; 29:68-74.
- 33- Kern P, Kron M, Hiesche K. Measurement of Antinuclear Antibodies: Assessment of Different Test Systems. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7:72-8.
- 34- Suarez-Almazor ME, Gonzalez-Lopez L, Gamez-Nava JI, Belseck E, Kendall CJ, Davis P. Utilization and predictive value of laboratory tests in patients referred to rheumatologists by primary care physicians. *J Rheumatol* 1998; 25:1980-5.
- 35- Slater CA, Davis RB, Shmerling RH. Antinuclear antibody testing – A study of clinical utility. *Arch Intern Med* 1996; 156:1421-5.